

1. Einleitung

1.1 Biochemie und Physiologie der Blutgerinnung

Zweck der Blutgerinnung ist es, den Körper bei Verletzung des Gefäßsystems durch eine örtlich und zeitlich begrenzte Reaktion vor Blutverlust zu schützen. Die Gerinnung beinhaltet eine Kaskade sukzessiver enzymatischer Aktivierungsschritte, bei denen jeweils ein inaktives Zymogen durch limitierte proteolytische Spaltung einer oder mehrerer Peptidbindungen in eine aktive Protease überführt wird. Diese Reaktionskaskade über mehrere Amplifikationsstufen bedingt einen Verstärkungseffekt, der eine rasche Reaktion auf einen auslösenden Reiz ermöglicht.

Auf jeder Stufe erfolgt die Spaltung eines Proenzym durch die aktivierte Protease des vorangegangenen Schrittes zu einem aktiven Enzym, das seinerseits das nächste Zymogen der Kaskade aktiviert. Bei den Enzymen handelt es sich um Serin-Proteasen. Die an der Gerinnung beteiligten Proteine werden als *Gerinnungsfaktoren* bezeichnet.

Der Prozess der Blutstillung bedingt ein komplexes Zusammenwirken von Gerinnungsfaktoren, Blutplättchen, Gefäßendothel und Gefäßmuskulatur (Davie & Fujikawa, 1975; Jackson & Nemerson, 1980; Jackson, 1984; Tracy, 1988; Furie & Furie, 1988). Bei einer Gefäßverletzung erfolgt zunächst eine Aktivierung und Adhäsion von Blutplättchen in der geschädigten Region. Durch Ausbildung eines Thrombozyten-Pfropfes kommt es vorübergehend zu einer Abschwächung bzw. Stopppung des Blutverlustes. Wichtig für die Aggregation der Blutplättchen und die Pfropf-Bildung sind Plasmaproteine wie von Willebrand Faktor und Fibrinogen, die an spezifische Zelloberflächenrezeptoren aktivierter Blutplättchen einerseits und dem Subendothel andererseits binden können. Dadurch werden die Thrombozyten sowohl untereinander als auch mit Subendothelzellen verbrückt (Girma et al., 1987; Ruggeri & Zimmerman, 1987; Lopez et al., 1988; Hickey et al., 1989; Bennett et al., 1982; Savage & Ruggeri, 1991).

Die Aktivierung der Gerinnungsfaktoren läuft an negativ geladenen Membranoberflächen ab, die von aktivierten Blutplättchen oder geschädigten Zellen zur Verfügung gestellt werden. Derartige prokoagulatorische Oberflächen befinden sich bei intakten

Gefäßen auf der dem Blut abgewandten Seite und kommen erst bei einer Gefäßverletzung in Kontakt mit Blut. Bei nichtaktivierten Blutplättchen beispielsweise sind negativ geladene Phospholipide (PL) vorwiegend auf der cytosolischen Seite der Doppelmembran lokalisiert. Eine Exposition der anionischen Phospholipide (z.B. Phosphatidylserin) zum Blut hin erfolgt durch Thrombozyten-Aktivierung bei Gefäßverletzung. Ein gemeinsames Merkmal aller Aktivierungsschritte (mit Ausnahme der Aktivierung von Faktor IX durch Faktor XIa) besteht in der Bildung eines Komplexes, bestehend aus einer aktivierten Protease, die die nachfolgende Spaltungsreaktion katalysiert, einem Protein-Kofaktor, Ca^{2+} -Ionen und der anionischen Phospholipid-Oberfläche. Das Substrat-Molekül assoziiert an diesen Komplex und wird prozessiert (Tans & Rosing, 1986; Mann, 1987; Tracy, 1988).

Die Bindung der Proteasen, Kofaktoren oder Zymogene (Substrate) an eine negativ geladene, prokoagulatorische Oberfläche erfolgt über funktionelle Domänen dieser Proteine. Im Falle der Vitamin K-abhängigen Gerinnungsfaktoren (Faktor II, VII, IX, X, Protein C und Protein S), die in der Leber gebildet werden, findet man Bereiche mit γ -Carboxyglutaminsäure (Gla)-Resten als besonderem Strukturmerkmal vor. Diese entstehen bei einer posttranslationalen Modifikation von Glutaminsäureresten durch Carboxylasen in Gegenwart von Vitamin K (Stenflo et al., 1974; Magnusson et al., 1974; Nelsestuen et al., 1974). Sie vermitteln über komplexierte Ca^{2+} -Ionen die Bindung der betreffenden Gerinnungsfaktoren an die negativ geladenen Phospholipid-Oberflächen (z.B. Membranen aktivierter Blutplättchen) (Mann, 1987; Tracy, 1988). Die in Gegenwart von Vitamin K-Antagonisten (z.B. Cumarin, Warfarin) gebildeten Faktoren II, VII, IX und X weisen keine bzw. eine unvollständige Anzahl von Gla-Resten auf. Als Konsequenz können sie nicht mehr an Membranoberflächen binden, was den Ablauf der Gerinnung beeinträchtigt. Die antikoagulatorischen Eigenschaften dieser Substanzen nutzt man für die Prophylaxe bzw. Behandlung von Thrombosen und Embolien aus (Stenflo & Suttie, 1977; Hemker & Frank, 1985).

Gemäß dem so genannten Wasserfall- bzw. Kaskadenmodell ist eine Initiierung der Blutgerinnung zum einen über den „intrinsischen Weg“ und zum anderen über den „extrinsischen Weg“ möglich (MacFarlane, 1964; Davie & Ratnoff, 1964). Diese münden auf der Stufe der Aktivierung von Faktor X letztlich in einen gemeinsamen Weg ein, der über die Aktivierung von Prothrombin zur Fibrinogenspaltung und Bildung eines Fibrinnetzwerks führt. Ein schematischer Überblick über die Blutgerinnungskaskade ist in Abbildung 1 dargestellt.

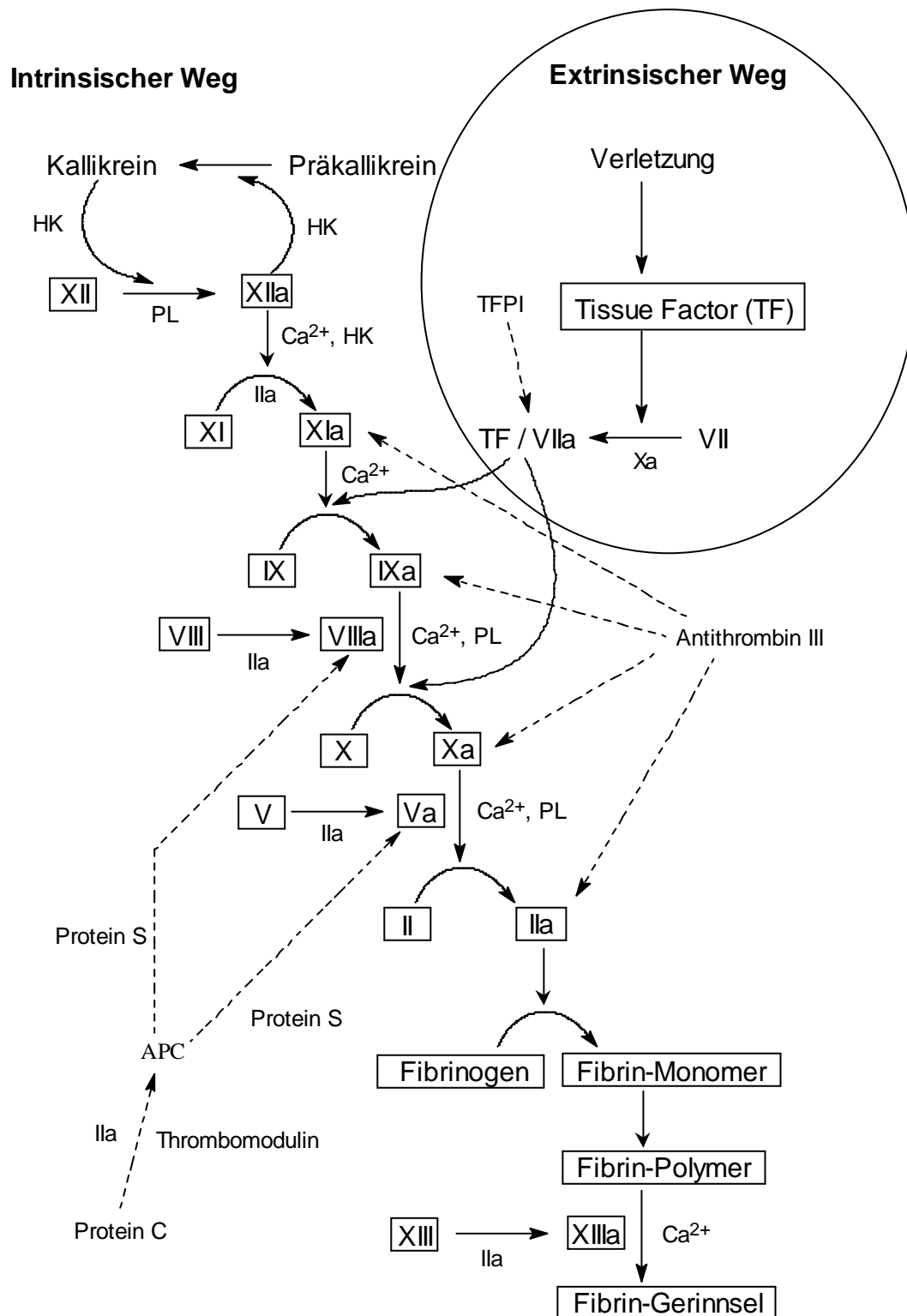


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Blutgerinnungskaskade. Nach dem Kaskadenmodell (MacFarlane, 1964; Davie & Ratnoff, 1964) ist die Initiierung der Blutgerinnung über einen intrinsischen und einen extrinsischen Weg möglich, die letztlich in einen gemeinsamen Weg einmünden, der zur Bildung eines Fibrin-Gerinnsels führt. Weitere Erläuterungen im Text. Römische Ziffern kennzeichnen die betreffenden Gerinnungsfaktoren. Aktivierte Gerinnungsfaktoren werden durch den Buchstaben „a“ charakterisiert. Gerinnungsfördernde Reaktionen sind durch durchgezogene Pfeile, gerinnungshemmende durch gestrichelte Pfeile wiedergegeben.

Im Rahmen des intrinsischen Wegs erfolgt zunächst eine Kontaktphasenaktivierung (Kaplan, 1978) von Faktor XII an negativ geladenen Oberflächen. An diesem Vorgang sind darüber hinaus die Proteine Präkallikrein und hochmolekulares Kininogen (HK) beteiligt. Im Falle einer Verletzung kommt es zur Anlagerung des Faktors XII an subendotheliales Gewebe über eine kollagenbindende Domäne am N-Terminus. In diesem Zustand erfolgt die Aktivierung des Proenzym durch Kallikrein, das im Komplex mit hochmolekularem Kininogen ebenfalls an die negativ geladene Oberfläche bindet. Faktor XIIa seinerseits kann Präkallikrein in die aktive Form überführen und somit seine eigene Generierung im Rahmen eines positiven Rückkoppelungs-Mechanismus begünstigen. Faktor XI zirkuliert im Blut ebenfalls als Komplex mit HK, das ihn an den Ort der Verletzung dirigiert, wo er durch Faktor XIIa, im Zusammenwirken mit HK und Ca^{2+} -Ionen, aktiviert wird (Bouma et al., 1986). Faktor XIa aktiviert Faktor IX, der seinerseits dann die Prozessierung von Faktor X katalysiert. Auf dieser Stufe münden der intrinsische und der extrinsische Aktivierungsweg in den gemeinsamen Weg ein.

Wesentlich wichtiger als der oben beschriebene intrinsische Weg der Gerinnungsaktivierung ist der extrinsische Weg. Im Falle einer Verletzung erfolgt die Initiierung der Blutgerinnung fast ausschließlich über diesen Weg. Bei dem Auslöser, dem so genannten Gewebefaktor („Tissue Factor“, TF) handelt es sich nicht um ein Enzym. Es ist ein Transmembran-Glykoprotein, das von Zellen des Subendothels konstitutiv exprimiert und normalerweise durch das Gefäßendothel vor einem Kontakt mit dem Blut geschützt wird (Weiss et al., 1989; Wilcox et al., 1989). Humaner TF setzt sich aus einer einzelnen Polypeptidkette mit einer Länge von 263 Aminosäureresten zusammen, verfügt über einen kleinen cytoplasmatischen Teil, eine Transmembran-Domäne und eine große extrazelluläre Domäne (Broze et al., 1985). Im Falle einer Gefäßverletzung kommt der TF in Kontakt mit Plasma. Daraufhin kann der darin zirkulierende Faktor VII bzw. der in geringen Anteilen vorliegende aktivierte Faktor VII (erzeugt durch minimale, über den intrinsischen Wegs gebildete Spuren Faktor Xa) über seine γ -Carboxyglutaminsäure-reiche Sequenz in Gegenwart von Ca^{2+} -Ionen an die Zelloberfläche binden und sich an den extrazellulären Teil des TF assoziieren. Der TF/ Faktor VIIa-Komplex kann durch Aktivierung von Faktor VII seine eigene Bildung beschleunigen (Nemerson & Repke, 1985; Rao & Rapaport, 1988; Sakai et al., 1989). Darüber hinaus aktiviert er sowohl Faktor X (Nemerson, 1966) als auch (vergleichsweise weniger bevorzugt) Faktor IX (Osterud & Rapaport, 1977; Broze et al.,

1990). TF fungiert bei der Aktivierung von Faktor VII, Faktor IX und Faktor X jeweils als Kofaktor, der diese Reaktionen wesentlich beschleunigt (Nemerson & Gentry, 1986). Nach Generierung von Faktor Xa münden der extrinsische und der intrinsische Weg in einen gemeinsamen Weg ein, der über Prothrombin-Spaltung, Fibrinogen-Prozessierung zur Bildung eines Fibringerinnsels führt.

Neuere Erkenntnisse lassen allerdings darauf schließen, dass das Wasserfall/Kaskaden-Modell mit seinen zwei separaten und redundanten Wegen für die Generierung von Faktor Xa, gefolgt von dem gemeinsamen Weg zur Fibrinbildung, die *in vivo* ablaufende Gerinnung nur unzureichend wiedergibt. Eine revidierte Theorie der Blutgerinnung (Broze et al. 1988 und 1990; Davie et al., 1991) geht davon aus, dass im Falle einer Verletzung die Initiierung der Blutgerinnung über den TF-vermittelten, extrinsischen Weg erfolgt.

Sobald dann Spuren an Faktor Xa entstanden sind, katalysiert dieser seine eigene Entstehung im Sinne einer positiven Rückkoppelung durch Aktivierung des Proenzym Faktor VII. Der extrinsische Weg erfährt später, bei ansteigender Konzentration des Faktors Xa, eine Feedback-Hemmung durch einen für ihn spezifischen Inhibitor, den so genannten „Tissue Factor Pathway Inhibitor“ (TFPI) (Broze, 1992; Davie et al., 1991). Dieser hemmt den TF / Faktor VIIa-Komplex und Faktor Xa durch die Ausbildung eines quaternären Komplexes mit diesen drei Proteinkomponenten, die nach der Aktivierung von Faktor X noch miteinander assoziiert sind. Innerhalb dieses Komplexes bindet TFPI an bestimmte Domänen von Faktor VIIa und Faktor Xa (Broze et al., 1988; Girard et al., 1989). Die Erzeugung weiterer Mengen Faktor Xa (und IXa) über das extrinsische System ist somit nicht mehr möglich und erfolgt auf einem anderen Weg. Der über den extrinsischen Weg gebildeten Faktor Xa überführt, in Komplex mit Faktor Va, Ca^{2+} und Phospholipiden (Prothrombinase-Komplex) einen Teil des Prothrombins in die aktive Form (Tracy et al., 1981). Das zunächst in geringer Konzentration generierte α -Thrombin aktiviert die Faktoren V, VIII (Nesheim & Mann, 1979; Esmon, 1979; Suzuki et al., 1982) und XI (Naito & Fujikawa, 1991; Gailani & Broze, 1991) und begünstigen dadurch seine eigene Bildung über den intrinsischen Weg.

Hierbei erfolgt durch Faktor XIa in Gegenwart von Ca^{2+} die Prozessierung von Faktor IX zur aktiven Form (DiScipio et al., 1978). Faktor IXa, in Komplex mit dem aktivierten Faktor VIII, Ca^{2+} -Ionen und anionischen Phospholipiden (Tenase-Komplex), katalysiert die Umwandlung von Faktor X zu Xa (van Dieijen et al., 1981).

Der aktivierte Faktor X katalysiert als Teil des Prothrombinase-Komplexes (Faktor Xa, Faktor Va, Ca^{2+} -Ionen und Phospholipiden) die Spaltung und Aktivierung von Prothrombin (Faktor II) unter Bildung von α -Thrombin (Faktor IIa) (Tracy et al., 1981). Prothrombin ist das einzige Proenzym unter den Gerinnungsfaktoren, bei dessen proteolytischer Aktivierung die an Phospholipidoberflächen bindende Gla-Domäne von der katalytischen Region abgetrennt wird. Damit eröffnen sich dem Enzym ein breites Spektrum von Reaktionen. Thrombin ist ein wichtiges Schlüsselenzym der Gerinnung: Es prozessiert das lösliche Plasmaprotein Fibrinogen zu Fibrin unter Freisetzung der Fibrinopeptide (Blombäck et al., 1977). Die gebildeten Fibrin-Monomere aggregieren untereinander und beschleunigen die Aktivierung von Faktor XIII zu Faktor XIIIa durch Thrombin in Gegenwart von Ca^{2+} -Ionen (Janus et al., 1983; Naski et al., 1991). Faktor XIIIa ist eine Transglutaminase, die die assoziierten Fibrinmonomere kovalent quervernetzt durch Bildung von Isopeptidbindungen (ϵ -(γ -glutamyl)lysin-Bindungen) zwischen benachbarten Molekülen (Lakai, 1972; Kanaide & Shainoff, 1975; Folk & Finlayson, 1977). Auf diese Weise entsteht ein festes Fibrin-Gerinnsel, wobei die Fibrin-Fibrillen den primären Wundverschluß der aggregierten Blutplättchen verstärken. Ein Abbau des Fibrin-Netzwerks kann später im Rahmen der Fibrinolyse durch Plasmin erfolgen (Bok & Mangel, 1985).

Thrombin bewirkt ferner über eine, durch die Spaltung eines Thrombin-Rezeptors initiierte Signalkaskade die Aktivierung und Aggregation von Blutplättchen (Vu et al., 1991). Die damit verbundene Verfügbarkeit von prokoagulatorischen Membranoberflächen ist von großer Bedeutung für die Gerinnung.

Gemäß der aktuellen Vorstellung erfolgt somit die Initiierung der Blutgerinnung über den extrinsischen Weg durch TF. Dem intrinsischen Weg (ausgehend von der Stufe der Aktivierung von Faktor XI durch Thrombin) hingegen kommt über die große Zahl an Amplifikationsstufen eine wichtige Rolle für die Verstärkung und Aufrechterhaltung der Fibrinbildung zu. Unterstützt wird diese Theorie durch die Beobachtungen, dass bei einem Faktor XI-Mangel schwere Gerinnungsstörungen bei Patienten zu beobachten sind, nicht hingegen bei einem Mangel an den Kontaktfaktoren (Faktor XII, Kallikrein oder hochmolekulares Kininogen) (Davie et al., 1991). Darüber hinaus steht sie im Einklang mit schweren Störungen der Blutgerinnung bei Patienten mit einem genetisch bedingten Mangel an den Gerinnungsfaktoren VIII und IX (Hämophilie A bzw. B) (Marlar et al, 1982; Sadler & Davie, 1987; Hedner & Davie, 1987).

Zur zeitlichen und lokalen Begrenzung der Gerinnung auf den Bereich einer Gefäßverletzung und zur Vermeidung einer systemweiten Koagulation ist der Prozess in hohem Maße reguliert. Nur im Bereich der Gewebsläsion stehen die für den Ablauf der Gerinnung wichtigen, anionischen Phospholipid-Oberflächen durch beschädigte zelluläre Membranen oder aktivierte Blutplättchen zur Verfügung. Und nur in diesem Abschnitt kommt der von Subendothelzellen gebildete TF in Kontakt mit Plasma bzw. dem darin zirkulierenden Faktor VII bzw. VIIa, was für die Initiierung der Gerinnungsbildung von Bedeutung ist.

Die Blutgerinnungskaskade wird hauptsächlich über die Konzentration des α -Thrombins reguliert, auf die Thrombin selbst Einfluss nimmt (Fenton, 1988a). Nach seiner Entstehung katalysiert es die Aktivierung der Faktoren V, VIII (Nesheim & Mann, 1979; Esmon, 1979; Suzuki et al., 1982) und XI (Naito & Fujikawa, 1991; Gailani & Broze, 1991). Dadurch beschleunigt es seine eigene Entstehung und die Fibrinbildung. Im gegenläufigen Prozess bindet Thrombin außerhalb der geschädigten Bereiche an Thrombomodulin, ein Transmembranprotein auf der Oberfläche von Endothelzellen (Esmon, 1987a; Esmon, 1987b). In Form dieses Komplexes gebunden, zeigt Thrombin nun antikoagulatorische Eigenschaften durch Aktivierung von Protein C (Esmon & Owen, 1981; Owen & Esmon, 1981; Esmon et al., 1982). Das aktivierte Protein C (APC) bewirkt, in Kombination mit Protein S und in Gegenwart anionischer Phospholipide und Ca^{2+} -Ionen, die Spaltung und Inaktivierung der Protein-Kofaktoren Va und VIIIa des Tenase- bzw. Prothrombinase-Komplexes (Kisiel et al., 1977; Marlar et al., 1982; Vehar & Davie, 1980; Esmon & Esmon, 1988; Walker, 1988). Das hat eine Hemmung des Gerinnungsprozesses zur Folge. Im Komplex mit Thrombomodulin verliert Thrombin auch seine Fähigkeit, Blutplättchen zu aktivieren.

Die Aktivität der an der Gerinnung beteiligten Proteasen wird durch eine Reihe von Inhibitoren reguliert. Außerhalb des Bereichs der Gefäßverletzung wird Thrombin schnell durch die Bildung eines äquimolaren Komplexes mit Antithrombin III (AT III) unter Blockierung des aktiven Zentrums gehemmt (Rosenberg & Damus, 1973; Griffith, 1986). Die inhibierende Wirkung des Antithrombin III erhöht sich in Gegenwart von Glykosaminoglykanen wie beispielsweise Heparin. Heparin bindet sowohl Thrombin, als auch Antithrombin III und beschleunigt deren Annäherung und Komplexierung (Jordan et al., 1980). Darüber hinaus bindet und hemmt AT III, verstärkt durch Heparin, auch andere, an der Gerinnung beteiligte Serinproteasen wie beispielsweise Faktor IXa (Kurachi et al., 1976), Xa (Kurachi et al., 1976) und XIa (Ku-

rachie & Davie, 1977). Weitere an der Regulation der Blutgerinnung beteiligte Hemmstoffe sind der Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI) (Broze et al., 1988 und 1992), der Thrombin-Inhibitor Heparin Kofaktor II (Tollefsen et al., 1982), α_2 -Makroglobulin (Scottrup-Jensen, 1987), Protein C Inhibitor (Suzuki et al., 1983), C1-Esterase Inhibitor und α_1 -Antitrypsin (Heeb & Griffin, 1988).

Schwankungen der Konzentration von Prothrombin und Antithrombin III beeinflussen im Gegensatz zu denen anderer, an der Gerinnung beteiligter Proteine, die Thrombin-Bildung sehr stark (Butenas et al., 1999)

Der hämostatische Prozess, der nach einer Gefäßverletzung die Bildung eines Blutgerinnsels sowie anschließende Wundheilung unter Regenerierung des Gefäßes einschließt, erfordert Wechselwirkungen zwischen Endothelzellen, Blutplättchen, Gerinnungsfaktoren und dem fibrinolytischen System (Fenton, 1986; Fenton 1988b, Colten, 1980). Ausfälle einer oder mehrerer Bestandteile dieses komplexen, verzahnten Systems beeinflussen den Vorgang der Blutgerinnung.

1.2 Struktur und Funktion von Prothrombin und Thrombin

Im Rahmen dieser Arbeit wird Prothrombin als Substrat-Molekül eingesetzt. In diesem Abschnitt erfolgt die Darstellung seines strukturellen Aufbaus, des physiologischen Aktivierungsprozesses durch Faktor Xa und eine Beschreibung der Eigenschaften des Prozessierungsprodukts Thrombin.

Struktureller Aufbau

Prothrombin ist die inaktive Vorstufe der Serinprotease Thrombin, die eine zentrale Rolle für die Blutgerinnung und Wundheilungsmechanismen spielt. Es zirkuliert im Plasma in einer Konzentration von 1–2 μM und ist das häufigste aller Vitamin K-abhängigen Gerinnungsproteine (McDuffie et al., 1979). Humanes Prothrombin wird als Präproprotein mit einer Länge von 622 Aminosäuren in der Leber synthetisiert. Das N-terminale Präpropeptid (43 Aminosäurereste) besteht aus einer Signalsequenz und einem Propeptid, die im Verlauf der Reifung des Präprothrombins abgespalten werden (Mann, 1994). Reifes Prothrombin enthält γ -Carboxyglutaminsäurereste, die durch posttranslationale Modifizierungsreaktionen (Carboxylierungen) der ersten 10 aminoterminalen Glutaminsäurereste gebildet werden. Darüber hinaus weist es

drei Kohlenhydrat-Seitenketten auf, die über N-glykosidische Bindungen an Asparaginresten eingeführt werden. Die Primärstruktur des bovinen Prothrombins wurde durch Magnusson et al. (1975) bestimmt, wohingegen die Isolierung und vollständige Sequenzierung der zugehörigen cDNA durch MacGilvray & Davie (1984) erfolgte. Fast zeitgleich erfolgte die Strukturaufklärung des Gens von humanem Prothrombin durch Degan et al. (1983). Abbildung 2 zeigt die ermittelte Aminosäuresequenz des humanen Präprothrombins.

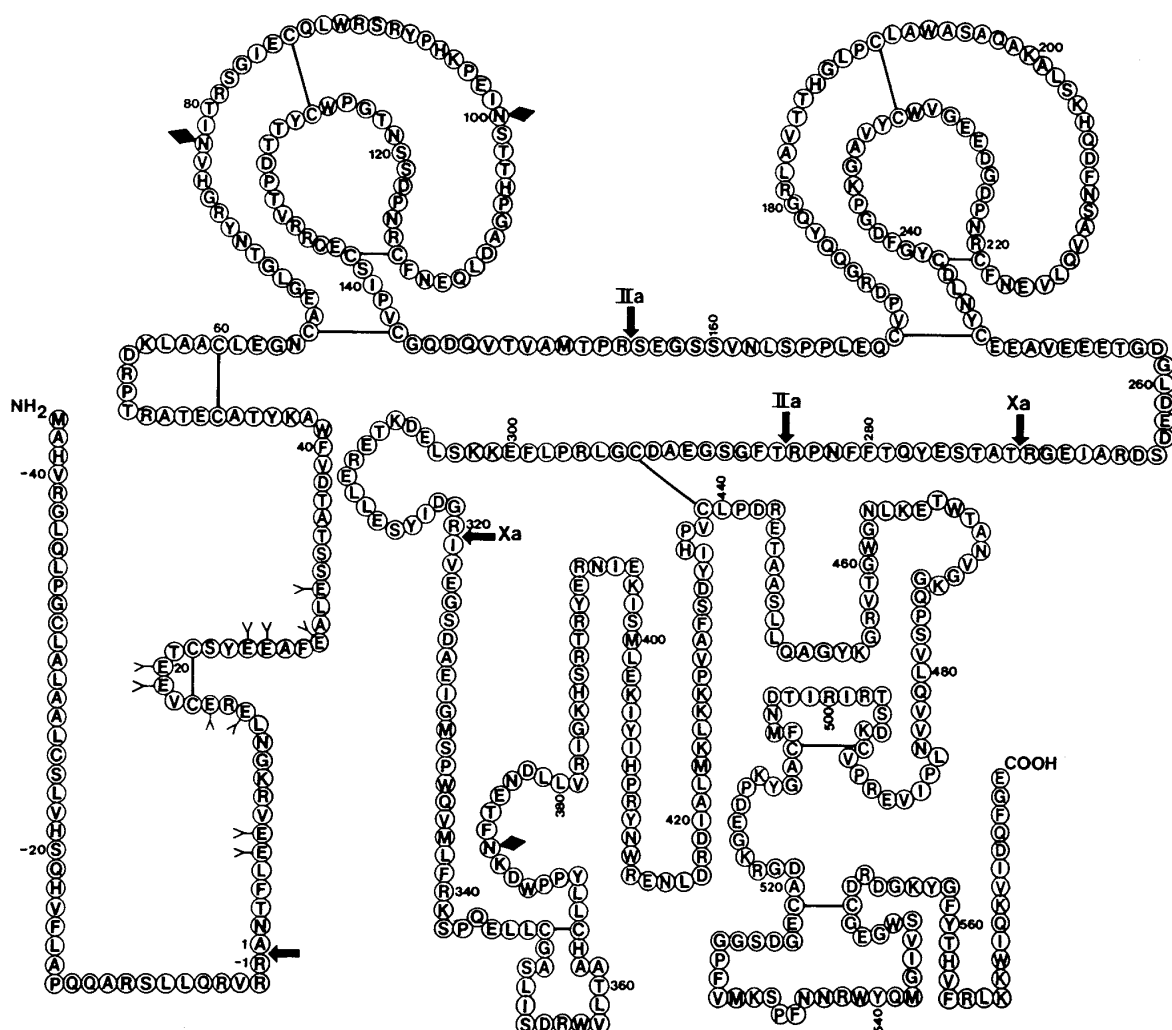


Abbildung 2: Die Primärstruktur des humanen Präprothrombins (Degan et al., 1983; Mann, 1994). Das Numerierungssystem orientiert sich an dem reifen, ins Blut sekretierten Prothrombin. Spaltstellen von Thrombin und Faktor Xa sind durch Pfeile wiedergegeben. Ausgefüllte Rauten kennzeichnen die Positionen dreier Kohlenhydrat-Seitenketten. Die 10 Gla-Reste sind durch Y-Symbole dargestellt.

Das im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendete Numerierungssystem orientiert sich an der Struktur des reifen, ins Blut sekretierten Prothrombins. Dieses weist eine

Länge von 579 Aminosäuren auf und ist aus vier Domänen aufgebaut. An die N-terminale Gla-Domäne (Rest 1 bis 40) schließt sich die Kringel 1-Domäne (Rest 41 bis 155), gefolgt von der Kringel 2-Domäne (Rest 156 bis 271), an. An seinem Carboxy-Ende trägt das Prothrombin-Molekül eine Serin-Protease-Vorläufer-Domäne (Rest 272 bis 579), die eine hohe Sequenzhomologie mit Mitgliedern der Chymotrypsinogen-Trypsinogen-Familie aufweist (Abbildung 3).

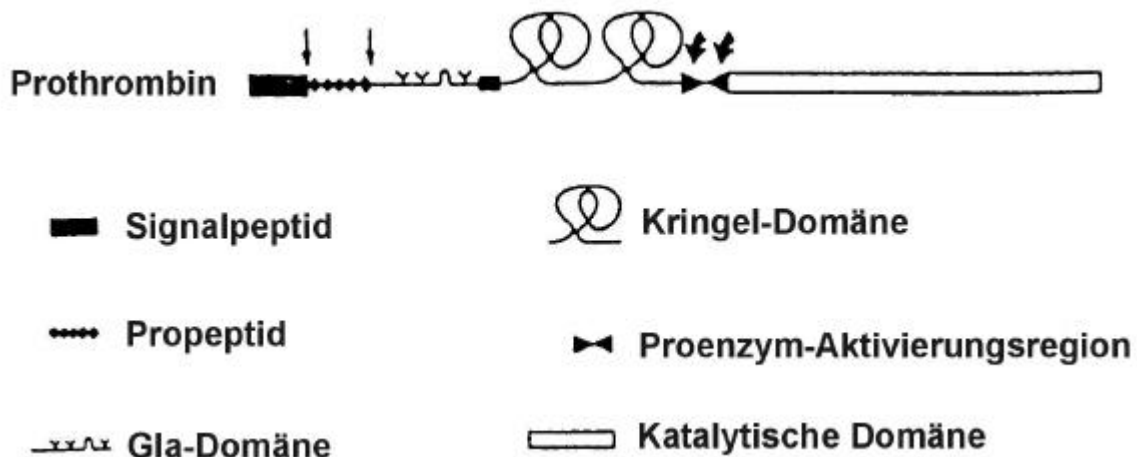


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Domänenstruktur des Präprothrombins. Auf ein N-terminales Signalpeptid folgt ein Propeptid. Daran schließt sich die Gla-Domäne, gefolgt von zwei Kringel Domänen an. Die C-terminale Serin-Protease-Vorläufer-Domäne lässt sich in eine Proenzym-Aktivierungsregion und die katalytische Domäne unterteilen.

Die in der Gla-Domäne enthaltenen 10 γ -Carboxyglutaminsäurereste entstehen durch posttranslationale Modifikation in der Leber. Ausgehend von Glutaminsäureresten erfolgt durch ein Carboxylase/Epoxidase-System der Einbau von CO_2 unter Bildung der modifizierten Aminosäurereste und damit einhergehender Oxidation der (reduzierten) Hydrochinon-Form des Kofaktors Vitamin K durch Sauerstoff (Stenflo et al., 1974; Suttie, 1985). Die entstandenen γ -Carboxyglutaminsäurereste ermöglichen die Bindung von Ca^{2+} -Ionen. Nach deren Komplexierung erfährt das Proteinmolekül eine Konformationsänderung (Nelsestuen et al., 1976; Prendergast & Mann, 1977). Diese ist essentiell für die Assoziation des Prothrombins über die an den γ -Carboxyglutaminsäureresten der Gla-Domäne komplexierten Ca^{2+} -Ionen an anionische Phospholipide einer biologischen Membran (Dombrose et al., 1979). Die Membranbindung ist wiederum bedeutend für eine optimale Präsentation des Prothrombin-Moleküls als Substrat für seine nachfolgende Aktivierung durch den Prothrombinase-

Komplex. Das in Gegenwart von Vitamin K-Antagonisten (z.B. dem Cumarin-Derivat Warfarin) gebildete Prothrombin zeichnet sich durch eine unvollständige Carboxylierung aus. Das Fehlen von γ -Carboxyglutaminsäureresten bedingt, dass kein Konformationswechsel und keine Komplexierung von Ca^{2+} -Ionen mehr im gebildeten „abnormen“ Prothrombin erfolgen kann (Nelsestuen & Suttie, 1972a; Stenflo & Ganrot, 1973). Damit einhergehend ist eine Ca^{2+} -vermittelte Bindung an anionische Phospholipid-Oberflächen nicht mehr möglich, wodurch das Prothrombin nicht mehr als geeignetes Substrat für den Prothrombinase-Komplex präsentiert und folglich nicht mehr aktiviert wird (Malhotra et al., 1985). Das abnorme Prothrombin ist somit nicht in der Lage, seine Funktion in der Gerinnung auszuüben (Nelsestuen & Suttie, 1972b; Stenflo, 1973).

Der Kringel 1-Domäne konnte noch keine physiologische Funktion zugeordnet werden. Kringel-Domänen sind ein gemeinsames Strukturmerkmal vieler Proteine der Gerinnungskaskade bzw. der Fibrinolyse. Ihre räumliche Faltung wird von Disulfid-Bindungen bestimmt (Park & Tulinsky, 1986; Patthy, 1985; McLean et al., 1987).

Die Kringel 2-Domäne, die eine hohe Sequenzhomologie mit der Kringel 1-Domäne aufweist, hat eine funktionelle Bedeutung für die Prothrombin-Aktivierung durch Bindung von Ca^{2+} -Ionen und durch Assoziation mit Faktor Va (Bajaj et al., 1975; Esmon & Jackson, 1974).

Die Serin-Protease-Vorläufer-Domäne am C-terminalen Ende des Prothrombin-Moleküls umfasst die vollständige Struktur von α -Thrombin und beinhaltet die katalytische Domäne.

Die physiologische Aktivierung des Prothrombins

In Abbildung 4 sind zwei Wege der Prothrombin-Aktivierung abgebildet. Wird Prothrombin durch Faktor Xa alleine in Anwesenheit von Ca^{2+} prozessiert, so erfolgt die Thrombin-Bildung unter Freisetzung des Prothrombin Fragments 1+2 (enthält Gla-, Kringel 1- und Kringel 2-Domäne) nur sehr langsam. Mechanistisch kommt es im ersten Schritt zur Spaltung der Bindung Arg₂₇₁-Thr₂₇₂, wobei Prothrombin Fragment 1+2 (Rest 1 bis 271) und Prethrombin 2 (Rest 272 bis 579) generiert werden. Prethrombin 2 erfährt im zweiten Schritt dann eine Spaltung der Arg₃₂₀-Ile₃₂₁-Peptidbindung unter Bildung des α -Thrombins (aktive Serinprotease).

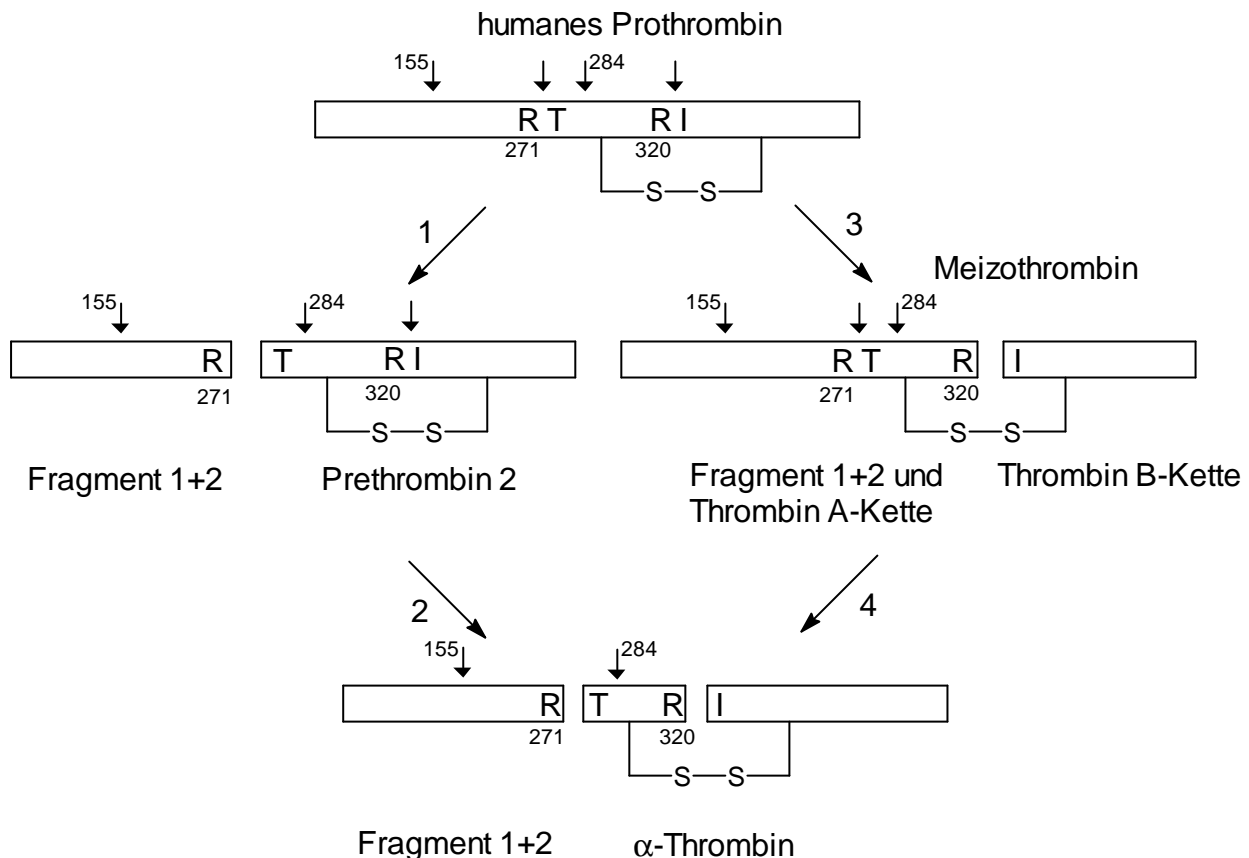


Abbildung 4: Zwei mögliche Aktivierungswege von Prothrombin. Durch Faktor Xa allein in Gegenwart von Ca^{2+} erfolgt zunächst eine Spaltung bei Arg₂₇₁ (1) unter Freisetzung des Prothrombin-Fragments 1+2 und von Prethrombin 2, das im nächsten Schritt (2) eine Spaltung der Bindung Arg₃₂₀-Ile₃₂₁ erfährt. Als Reaktionsprodukt entsteht α-Thrombin. Ein anderer Weg wird bei der Prothrombin-Aktivierung durch den Prothrombinase-Komplex beschritten. Hier erfolgt im ersten Schritt (3) die Proteolyse an Position 320. Das entstandene Zwischenprodukt Meizothrombin wird dann bei Arg₂₇₁ prozessiert (4) unter Bildung von α-Thrombin und Prothrombin Fragment 1+2, die miteinander assoziieren. An den Positionen 155 und 284 befinden sich autoproteolytische Spaltstellen von α-Thrombin.

Die Aktivierung des Prothrombins durch den Prothrombinase-Komplex (Faktor Xa, Faktor Va, Ca^{2+} -Ionen, Phospholipide) erfolgt wesentlich schneller und nach einem anderen Mechanismus (Nesheim et al., 1979). Im ersten Schritt wird die Peptidbindung Arg₃₂₀-Ile₃₂₁ unter Bildung des zweikettigen Zwischenproduktes Meizothrombin gespalten. Hierbei handelt es sich um ein Enzym, das amidolytische Aktivität gegenüber synthetischen, chromogenen Peptidsubstraten aufweist. Allerdings zeigt es weder Gerinnungsaktivität noch Blutplättchen aktivierende Aktivität. Im zweiten Schritt

erfolgt die Freisetzung von α -Thrombin und Prothrombin-Fragment 1+2 durch proteolytische Spaltung der Bindung Arg₂₇₁-Thr₂₇₂ in Meizothrombin.

Prothrombin, Prothrombin Fragment 1+2 und α -Thrombin können durch Thrombin an den Positionen 155 und 284 proteolytisch gespalten werden.

Die Kringel 2-Domäne im Prothrombin Fragment 1+2 bildet einen festen, nichtkovalenten Komplex mit α -Thrombin (Dissoziationskonstante $K_d = 10^{-8}$ M). Deshalb liegt das erzeugte α -Thrombin vermutlich nicht in freier Form, sondern komplexiert mit Prothrombin Fragment 1+2 oder Prothrombin Fragment 2 (Rest 156 bis 271), das nach autolytischer Thrombin-Spaltung bei Arg₁₅₅ entsteht und die Kringel 2 Domäne beinhaltet, vor (Myrmel et al., 1976; Nesheim et al., 1988).

Eigenschaften des Thrombins

Die als Endprodukt der Prothrombin-Prozessierung durch den Prothrombinase-Komplex entstehende Serinprotease α -Thrombin baut sich aus einer A-Kette und einer B-Kette auf. Die A-Kette besteht zunächst aus 49 Aminosäureresten und ist über eine Disulfidbrücke kovalent mit der B-Kette verbunden. Im Falle des humanen Enzyms, erkennt α -Thrombin nach Ausbildung des aktiven Zentrums seine eigene A-Kette als Substrat und spaltet bei Position Arg₂₈₄. Die resultierende A-Kette hat noch eine Länge von 36 Aminosäuren und übt keine bekannte physiologische Funktion aus (Downing et al., 1975; Hageman et al., 1975). Die B-Kette umfasst die 259 C-terminalen Aminosäurereste des Prothrombins und beinhaltet das aktive Zentrum. Sie weist darüber hinaus eine hohe Sequenzhomologie mit Serinproteasen wie Trypsin oder Chymotrypsin aus dem Pankreas auf. Verglichen mit der Primärstruktur des Chymotrypsins enthält α -Thrombin zusätzliche Aminosäuresequenzen, die auf DNA-Insertionen in den Regionen der Exonverknüpfungsstellen des Thrombin-Gens zurückzuführen sind (Fenton & Ring, 1986).

Im Vergleich mit den Serinproteasen aus der Bauchspeicheldrüse ist α -Thrombin durch eine hohe Substratspezifität und durch einige nicht-enzymatische, hormonähnliche Wirkungen charakterisiert (Fenton, 1988b). Fibrinogen wird durch Thrombin an vier spezifischen Arg-Gly-Bindungen gespalten unter Freisetzung der Fibrinopeptide. Die resultierenden Fibrin-Monomere aggregieren untereinander. Diese Polymerisation führt zur Ausbildung eines Fibrinnetzwerkes (Henschen & McDonagh, 1986).

α -Thrombin katalysiert außerdem die Prozessierung und Aktivierung von Faktor XIII, der die assoziierten Fibrin-Moleküle durch Transamidierungsreaktionen kovalent über Isopeptidbindungen verbindet. Hierdurch entsteht ein festes, quervernetztes Fibringerinnsel. Durch Aktivierung der Kofaktoren V und VIII stimuliert Thrombin den Gerinnungsprozess (Mann et al., 1988; Fay, 1988; Lollar & Parker, 1989). Nach Bindung an das auf der Oberfläche von Endothelzellen lokalisierte Membranprotein Thrombomodulin bewirkt α -Thrombin die Aktivierung des antikoagulatorischen Protein C-Wegs (Kisiel et al., 1977; Walker, 1981). Dieser mündet in der Spaltung und Inaktivierung der Kofaktoren Va und VIIIa, was den Prozess der Fibrinbildung hemmt (Esmon & Esmon, 1988; Esmon, 1989). Thrombin ist ferner über die Spaltung des Komplementfaktors C3 zu C3a und C3b an der Auslösung des alternativen Wegs des Komplementsystems beteiligt. Dieser mündet in Entzündungsreaktionen, die vor bakteriellen Wundinfektionen schützen. Faktor IIa bedingt bei Thrombozyten rezeptorvermittelte metabolische und morphologische Prozesse, die zu einer Aktivierung und Aggregation der Blutplättchen führen (Vu et al., 1991). Die Bildung eines Thrombozyten-Pfropfs bewirkt den ersten Verschluss einer Gefäßverletzung und wird durch das quervernetzte Fibringerinnsel, das im Rahmen der plasmatischen Blutgerinnung gebildet wird, verstärkt (van Dam-Mieras & Muller, 1986).

Im Verlauf der Blutgerinnung wird ein großer Teil des α -Thrombins durch den aktivierten Faktor XIII kovalent mit dem Fibrinnetzwerk verbunden (Liu et al., 1979; Seegers, 1986). Derart eingeschlossen und vor Hemmung durch Plasma-Protease-Inhibitoren geschützt, kann sich dieses Thrombin an Vorgängen beteiligen, die über Zellstimulation und Proliferation zur Regenerierung des geschädigten Gewebes führen. Beispielsweise kann die Proliferation von Makrophagen, Fibroblasten, Endothelzellen und Monozyten durch Thrombin stimuliert werden. Bei Endothelzellen führen die Wechselwirkungen mit Thrombin zur Ausschüttung von Gewebe-Plasminogenaktivator, der über Plasmin-Aktivierung den Vorgang der Fibrinolyse auslöst (Carney et al., 1984; Fenton, 1988b).

Das gerinnungsaktive α -Thrombin kann auf verschiedenen Wegen durch proteolytische Spaltreaktionen in andere Thrombin-Formen mit modifizierten Eigenschaften überführt werden (Abbildung 5). Durch autoproteolytische Spaltung der Bindungen Arg₃₈₂-Ile₃₈₃ und Arg₃₉₃-Asn₃₉₄ bzw. der Bindung Lys₄₇₄-Gly₄₇₅ entsteht aus α -Thrombin das β - bzw. β' -Thrombin. Diese Thrombinformen bauen sich aus drei

Polypeptidketten auf und stellen nur Zwischenprodukte dar. Die Spaltung der Peptidbindungen Arg₃₈₂-Ile₃₈₃ und Arg₃₉₃-Asn₃₉₄ im β' -Thrombin bzw. der Bindung Lys₄₇₄-Gly₄₇₅ im β -Thrombin resultiert dann in der Entstehung des vierkettigen γ -Thrombins.

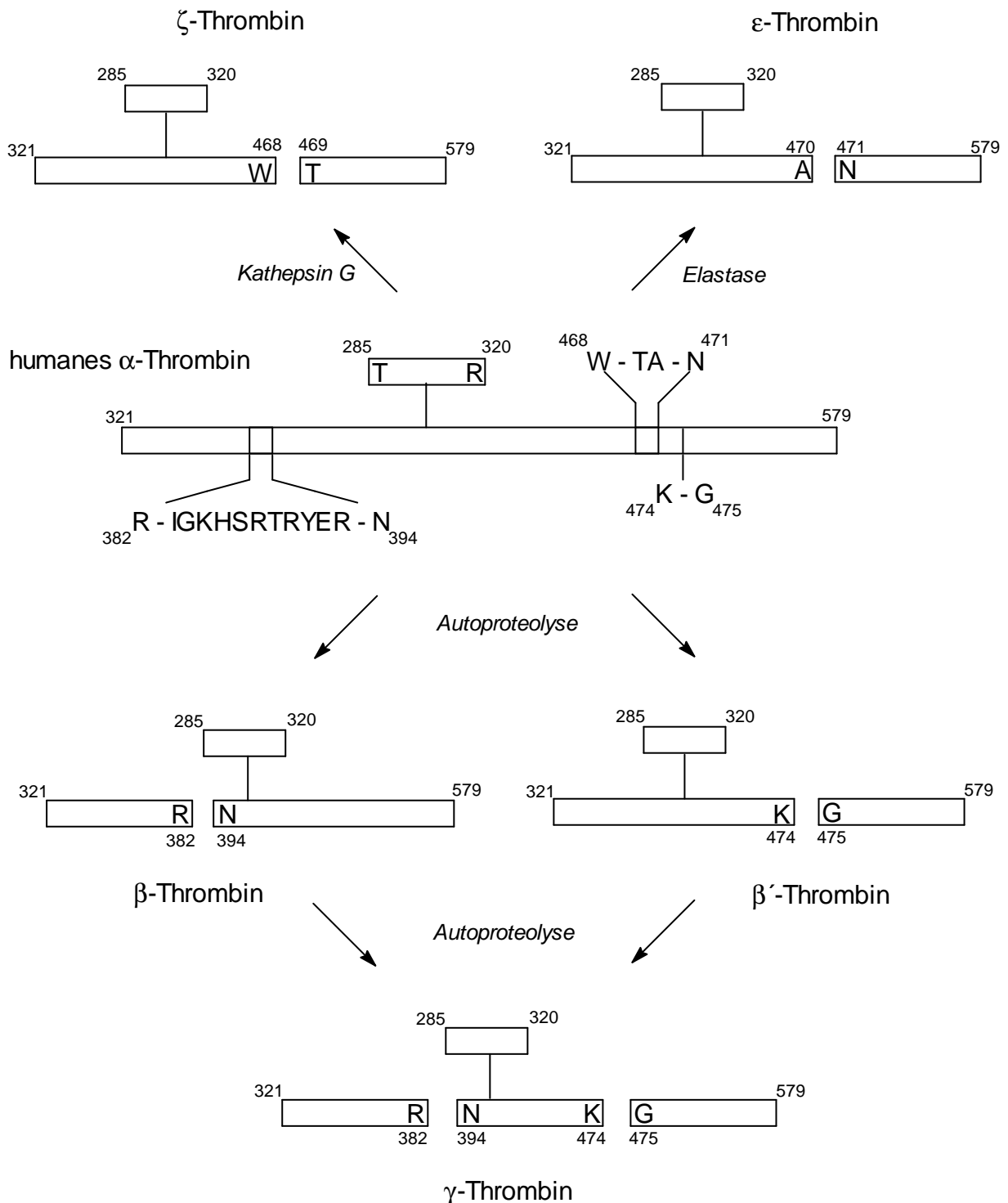


Abbildung 5: Proteolytische Spaltung von humanem α -Thrombin. Weitere Erläuterungen im Text.

Die β - und γ -Thrombin-Formen zeigen keine gerinnungsaktivierende Wirkung, weisen aber eine mit α -Thrombin vergleichbare amidolytische Wirkung auf künstliche Tripep-

tid-*p*-nitroanilide als Substrate auf (Chang, 1986; Fenton, 1986; Fenton & Bing, 1986). Die Serinproteasen Kathepsin G und Leukozyten-Elastase, die bei Entzündungsreaktionen aus Granula neutrophiler Granulozyten freigesetzt werden, bewirken ebenfalls die Bildung von Thrombin-Formen mit geringerer Gerinnungsaktivität. Humane Leukozyten-Elastase spaltet die Bindung Ala₄₇₀-Asn₄₇₁ in α -Thrombin (Brower et al., 1987), die in unmittelbarer Nachbarschaft zur autoproteolytischen Spaltstelle Lys₄₇₄ liegt. Das entstandene ϵ -Thrombin ähnelt stark dem β' -Thrombin und verfügt noch über 30 % der Gerinnungsaktivität von α -Thrombin bei gleicher Aktivität gegenüber synthetischen Peptidsubstraten. Dieselben enzymatischen Eigenschaften weist auch ζ -Thrombin auf, das nach Spaltung der Trp₄₆₈-Thr₄₆₉-Bindung in α -Thrombin durch Kathepsin G entsteht (Brezniak et al., 1990). Bedingt durch die langsame Autoproteolyse dürften die β -, β' - bzw. γ -Thrombinformen *in vivo* nur von untergeordneter Bedeutung sein. Dahingegen erfüllen ϵ - und ζ -Thrombin vermutlich Funktionen bei Wundheilungsprozessen nach der Gerinnungsbildung (Fenton & Bing, 1986; Seegers, 1986).

1.3 Exogene Prothrombin-Aktivatoren und andere Gerinnungsmodulatoren

Eine Vielzahl biologischer Substanzen, die die Gerinnung modulieren und für Gerinnungsanalysen und therapeutische Maßnahmen einsetzbar sind, wurden bei blutsaugenden Tieren und giftigen Schlangen entdeckt und isoliert. Manche blutsaugenden Organismen haben Strategien entwickelt, den Blutgerinnungsprozess durch Inhibitoren zu hemmen, um die Nahrungsaufnahme nicht aufgrund eines Versiegens des Blutstroms zu unterbrechen. Diese antikoagulatorischen Hemmstoffe wirken sich auf diskrete Prozesse der Gerinnung bzw. Fibrinolyse aus. Ein Vertreter dieser Klasse von Biomolekülen ist das Hirudin des Blutegels *Hirudo medicinalis*, das hochspezifisch Thrombin durch die Bildung eines festen äquimolaren, nichtkovalenten Komplexes (Dissoziationskonstante $K_d = 2 \times 10^{-14}$ M) unter Blockierung des aktiven Zentrums hemmt (Stone et al., 1986 und 1987). Weitere Beispiele sind der Faktor Xa-Inhibitor „tick anticoagulant peptide“ (TAP) der Zecke *Ornithodoros moubata* (Waxman et al., 1990) oder das „Ancylostoma caninum anticoagulant protein“ (AcAP) des Hakenwurms *Ancylostoma caninum* (Stassens et al., 1996).

Zahlreiche Schlangenarten produzieren Gifte zur Verteidigung oder zum Töten und Verdauen einer Beute, die neben anderen Aktivitäten auch Enzyme enthalten, welche die Blutgerinnung beeinflussen können. Häufig wirken diese Proteasen prokoagulatorisch durch direkte Aktivierung von Gerinnungsfaktoren. Beispielsweise enthält das *Russell's viper venom* sowohl einen direkten Aktivator von Faktor V (Schiffman et al., 1969) als auch einen Faktor X-Aktivator (Jackson et al., 1971; Kisiel et al., 1976). Eine Prozessierung von Fibrinogen beobachtet man durch Thrombin-ähnliche Serinproteasen wie Ancrod aus *Agkistrodon rhodostoma* (Hatton, 1973; Nolan et al., 1976) oder Crotalase aus *Crotalus adamanteus* (Markland & Damus, 1971; Markland & Pirkle, 1977).

Eine Vielzahl von Prothrombin-Aktivatoren aus Schlangen sind in der Literatur beschrieben (Rosing & Tans, 1991) und werden in unterschiedliche Gruppen eingeteilt.

Prothrombin-Aktivatoren der *Gruppe 1* sind Metalloproteasen, die, im Gegensatz zur Serinprotease Faktor Xa im Prothrombinase-Komplex, nicht von Phospholipiden oder dem aktivierten Faktor V abhängig sind. Weiter unterteilt wird diese Klasse in Proteasen, die auch unabhängig von Ca^{2+} -Ionen sind, wie beispielsweise Enzyme aus den Schlangengiften von *Bothrops jararaca* (Nahas et al., 1979) oder *Dipholidus typus* (Guillin et al., 1978; Bradlow et al., 1980), und Ca^{2+} -abhängige Aktivitäten wie die Carinactivase aus dem *Echis carinatus venom* (Yamada et al., 1996). Zur ersten Kategorie zählt auch das Ecarin, ein weiterer prominenter Prothrombin-Aktivator aus dem *Echis carinatus venom* (Kornalik & Blombäck, 1975; Morita & Iwanaga, 1981). Ecarin spaltet Thrombin, analog zu Faktor Xa im Prothrombinasekomplex, an der Bindung $\text{Arg}_{320}\text{-Ile}_{321}$ unter Bildung des enzymatisch aktiven Meizothrombins. Im Gegensatz zur Aktivierung durch Faktor Xa spaltet Ecarin aber dann nicht an Position Arg_{271} . Vielmehr erfährt Meizothrombin eine autokatalytische Spaltung an Position Arg_{155} , was zur Entstehung des Zwischenprodukts Meizothrombin-des-Fragment 1 und Freisetzung des Prothrombin Fragments 1 führt. Eine weitere autokatalytische Spaltung bei Arg_{284} im Meizothrombin-des-Fragment 1 resultiert in der Bildung von α -Thrombin (Morita et al., 1976; Doyle & Mann, 1990).

Auch die anderen Vertreter der Klasse 1 prozessieren Prothrombin zunächst zu Meizothrombin, das autokatalytisch zu α -Thrombin gespalten wird (Rosing & Tans, 1991). Die Tatsache, dass sie nicht durch Plasma-Serinprotease-Inhibitoren wie Antithrombin III hemmbar sind, macht die Gruppe 1-Enzyme zu den für Menschen gefährlichsten Prothrombin-Aktivatoren aus Schlangengiften (Yamada et al., 1996).

Gruppe 2 umfasst Prothrombin-Aktivatoren, deren Aktivität in Gegenwart von Ca^{2+} , Phospholipiden und aktiviertem Faktor V signifikant erhöht wird. Die strukturellen und funktionellen Eigenschaften der Proteasen dieser Gruppe ähneln stark denen des Faktors Xa im Prothrombinase-Komplex. Es handelt sich ebenfalls um Serin-Proteasen, die γ -Carboxyglutaminsäurereste enthalten. Beispiele solcher Aktivitäten sind Faktor II-Aktivatoren aus den Giften der Schlangen *Notechis scutatus scutatus* (Jobin & Esnouf, 1966; Tans et al., 1985) und *Tropidechis carinatus* (Chester & Crawford, 1982; Marshall & Hermann, 1983).

Die Proteasen der Gruppe 2 spalten, ebenso wie Faktor Xa (im Gegensatz zu den Vertretern der Gruppe 1), Prothrombin sowohl an Position Arg₃₂₀, als auch an Arg₂₇₁ unter Entstehung der Zwischenprodukte Prethrombin 2 bzw. Meizothrombin und letztlich von α -Thrombin (Rosing & Tans, 1991).

Zur *Gruppe 3* zählen Schlangengift-Prothrombin-Aktivatoren, deren Aktivität durch Ca^{2+} -Ionen und Phospholipide stimuliert wird. Die Vertreter dieser Kategorie sind multimere Proteine mit einem hohen Molekulargewicht und beinhalten sowohl eine katalytische Faktor Xa-analoge, als auch eine regulatorische Faktor Va-analoge Untereinheit. Die Prothrombin-Aktivierung führt hier ebenfalls nach Spaltung der Bindungen Arg₂₇₁-Thr₂₇₂ und Arg₃₂₀-Ile₃₂₁ über Prethrombin 2 bzw. Meizothrombin zu α -Thrombin (Rosing & Tans, 1991). Gut charakterisierte Beispiele dieser Klasse sind Schlangengift-Enzyme aus *Oxyranus scutellatus* (Owen & Jackson, 1973; Pirkle et al., 1972) und *Pseudonaja textilis* (Masci et al., 1988).

Prothrombin-Aktivatoren der Gruppen 2 und 3 wurden bislang nur in den Giften australischer Schlangen identifiziert.

Gruppe 4 besteht aus Schlangengift-Proteasen, die Peptidbindungen in Prothrombin spalten können, was aber nicht zur Bildung enzymatisch aktiver Produkte führt. Bei diesen Enzymen handelt es sich um Thrombin-ähnliche Aktivitäten, wie beispielsweise Ancrod oder Crotalase. Im Verlauf der Prothrombin-Prozessierung produzieren sie Prethrombin 1 und Prethrombin 2 (Rosing & Tans, 1991). Ancrod und Crotalase spalten Fibrinogen unter Bildung von Fibrin (Hatton, 1973; Markland & Pirkle, 1977).

Einige Enzyme aus Schlangengift werden als diagnostische Werkzeuge in der Analytik von Blut und Blutprodukten eingesetzt. Beispiele hierfür sind der Faktor X-Aktivator RVV-X oder der Prothrombin-Aktivator Ecarin.

Ein Ansatz zur Gewinnung der Enzyme besteht darin, Schlangen zu melken und die Proteasen dann aus den erhaltenen Giften zu reinigen. Alternativ lassen sich die betreffenden Strukturgene in geeignete Vektoren klonieren mit dem Ziel, die Aktivitäten rekombinant herzustellen (Itoh et al., 1987). Das bietet zum einen den Vorteil, dass die Enzyme häufig in größeren Mengen erhältlich sind und zum anderen vermeidet man den direkten Umgang mit gefährlichen Schlangen.

Auch einige Bakterien produzieren Substanzen, die die Blutgerinnung beeinflussen können, wie beispielsweise Prothrombin-aktivierende Proteine. Prominente Beispiele dafür sind die Staphylocoagulase aus *Staphylococcus aureus* (Hendrix et al., 1983; Kawabata et al., 1985) und die Peptocoagulase aus *Peptococcus indolicus* (Switalski et al., 1978). Hierbei handelt es sich nicht um Enzyme und im Verlauf des Aktivierungsprozesses werden keine Peptidbindungen im humanen Faktor II gespalten. Die Prothrombin-Aktivierung erfolgt vielmehr über die Bildung eines äquimolaren Komplexes mit dem bakteriellen Protein. Dies bewirkt Konformationsänderungen im Prothrombin-Molekül, die zur Bildung und Exposition des aktiven Zentrums führen. Die entstandenen Komplexe sind nun in der Lage, sowohl künstliche, chromogene Peptidsubstrate von Thrombin zu spalten, als auch Fibrinogen zu prozessieren. Ebenso wie im Falle der Aktivierung durch α -Thrombin erfolgt dabei die Freisetzung der Fibrinopeptide und die Bildung eines Fibringerinnsels.

Staphylococcus aureus bildet darüber hinaus auch noch eine 38 kDa schwere Metalloprotease, die Prothrombin durch Spaltung von Peptidbindungen aktiviert (Drapeau, 1978; Wegrzynowicz et al., 1980). Ein ähnliches Enzym wird von *Pseudomonas aeruginosa* produziert (Pulverer et al., 1980).

Bei den oben beschriebenen Organismen handelt es sich um humanpathogene Keime, die schwere Infektionen auslösen können. Die von ihnen produzierten Prothrombin-Aktivatoren könnten im Zusammenhang mit bestimmten Krankheitserscheinungen stehen und Pathogenitätsfaktoren darstellen (Drapeau, 1978; Switalski et al., 1978). Im Verlauf einer Infektion mit *Staphylococcus aureus*, die bei immungeschwächten Personen tödlich enden kann, treten beispielsweise häufig Thrombosen, Embolien und andere schwere Störungen der Gerinnung auf.

1.4 Aufgabenstellung

Bakterielle Proteine, die Gerinnungsfaktoren aktivieren, könnten für bestimmte Krankheitserscheinungen bei humanpathogenen Organismen relevant sein. Möglicherweise bieten sie einen Ansatzpunkt für diagnostische und therapeutische Maßnahmen.

Solche Aktivitäten könnten ferner als diagnostische Werkzeuge in der biomedizinischen Analytik eingesetzt werden. Sie wären möglicherweise eine billigere, in größeren Mengen erzeugbare Alternative zu bereits in der Diagnostik von Blutprodukten eingesetzten, etablierten Enzymen aus Schlangengiften. Im Vergleich zur (ggf. rekombinanten) Herstellung einer bakteriellen Protease und Isolierung aus einer Massenkultur, könnte beispielsweise die Gewinnung des in der Gerinnungsanalytik häufig eingesetzten Ecarins aus dem *Echis carinatus venom* mit höheren Kosten, Aufwand und mit geringerer Ausbeute verbunden sein. Da die Herstellung der meisten kommerziell erhältlichen Schlangengift-Enzyme durch Melken der Schlangen und Isolierung der entsprechenden Komponenten erfolgt, besteht ein weiterer Vorteil eines bakteriellen Enzyms in der Vermeidung des Umgangs mit gefährlichen Schlangen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte eine Reihe bakterieller Organismen auf die Fähigkeit zur Bildung von Gerinnungsaktivatoren hin untersucht werden. Da in der Literatur die Existenz von direkten Prothrombin-Aktivatoren (Staphylocoagulase, Peptocoagulase) schon beschrieben ist, war das erste Ziel das Auffinden solcher Aktivitäten. Anschließend sollte die Isolierung und biochemische Charakterisierung erfolgen. Insbesondere sollte auch ihre Eignung für einen potentiellen Einsatz als diagnostische Werkzeuge in der Analytik getestet werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Biologisches Material

<i>Aeromonas hydrophila</i>	Isoliert am Paul-Ehrlich-Institut, Langen
<i>Aeromonas hydrophila</i> (Referenzstämme Nr. 6173, 6394, 30014)	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig
<i>Bacillus cereus</i> (Referenzstamm Nr. 3101)	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig
<i>E. coli</i> (Referenzstamm Nr. 4760)	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig
<i>Klebsiella</i> (Referenzstamm Nr. 7460)	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Referenzstamm Nr. 1253)	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig
<i>Pseudomonas putida</i> (Referenzstamm Nr. 7162)	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig
<i>Serratia liquefaciens</i> (Referenzstamm Nr. 30064)	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig
<i>Serratia marcescens</i> (Referenzstamm Nr. 12481)	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig
<i>Staphylococcus aureus</i> (Referenzstamm Nr. 2569)	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (Referenzstamm Nr. 3270)	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig
<i>Streptococcus faecalis</i> (Referenzstamm Nr. 8629)	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig

2.1.2 Oligodesoxynukleotide

TK-1	CAA GAC CGG CAA GTA TTT CTA	ARK Scientific, Darmstadt
TK-2	ACG TAG AGA TCC GCA TCC CCG	ARK Scientific, Darmstadt

TK-3	AGG TCG CGT GAT TGA GGT TGA	ARK Scientific, Darmstadt
TK-4	TCA ACG CCT CCT GTG GTA CCA	ARK Scientific, Darmstadt

2.1.3 Proteine

β -Amylase (Süßkartoffel)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
α_2 -Antiplasmin	Aventis Behring GmbH, Marburg
Antithrombin III	Immuno, Wien, Österreich
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Bovines Thrombin	Dade, München
Carboanhydrase (Rind)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Cystatin (Huhn)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Cytochrom C (Pferd)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Echis carinatus venom (ECV)	Kordia, Leiden, Niederlande
Hirudin	Geschenk von Herrn PD Dr. Dodt (Paul-Ehrlich-Institut, Langen)
Humaner Faktor V	Callbiochem, Nottingham, England
Humaner Faktor VII	Kordia, Leiden, Niederlande
Humaner Faktor VIII	Aventis Behring GmbH, Marburg
Humaner Faktor IX	Aventis Behring GmbH, Marburg
Humaner Faktor X	Paul-Ehrlich-Institut, Langen
Humaner Faktor XI	Kordia, Leiden, Niederlande
Humaner Faktor XIII	Kordia, Leiden, Niederlande
Humanes Fibrinogen	Aventis Behring GmbH, Marburg
Humanes Prothrombin	Kordia, Leiden, Niederlande
Humanes Serumalbumin (HSA)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Humanes Thrombin	Kordia, Leiden, Niederlande
Humaner Tissue Factor (TF)	Dade, München
Kollagen Typ I	Roche, Mannheim
α_2 -Makroglobulin	Kordia, Leiden, Niederlande
Plasma-hyaluronsäurebindende Serinprotease (PHBSP)	Geschenk von Herrn Dr. Etscheid (Paul-Ehrlich-Institut, Langen)
Protein G-Peroxidase Konjugat	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen

Restriktionsendonuklease

<i>Xho</i> I (10 U/μl)	Promega Corporation, Madison, WI, USA
Russel's Viper Venom (RVV)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
ExtrAvidin-Peroxidase Konjugat	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Anti-DIG-alkalische Phosphatase Konjugat	Roche, Mannheim

2.1.4 Chemikalien

Acrylamid	Merck KGaA, Darmstadt
Agarose	Amresco, Solon, Ohio, USA
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Ammoniumsulfat (AS)	Merck KGaA, Darmstadt
Benzamidin-Sepharose	Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
Benzamidin	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
N,N-bis[2-Hydroxyethyl]glycin (BICINE)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
2-bis[2-Hydroxyethyl]amino-2-[hydroxymethyl]-1,3-propandiol (BIS-TRIS)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat, 4-toluidinsalz (BCIP)	Roche, Mannheim
Calciumchlorid, Dihydrat	Serva, Heidelberg
Chromogene Substrate S-2238 und S-2765	Haemochrom diagnostica, Essen, Deutschland
Chromogenes Substrat Pefochrome IIa	Pentapharm, Basel, Schweiz
Cobaltchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
3,3'-Diaminobenzidin (DAB)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
D-Phe-Pro-Arg-chloromethylketon (PPACK)	Callbiochem, Bad Soden
D-Phe-Pro-Arg-chloromethylketon, biotinyliert	Callbiochem, Bad Soden
L- <i>trans</i> -Epoxysuccinylleucylamido-(4-guanidino)-butan (E-64)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen

Ethylendiamintetraessigsäure, Dinatriumsalz Dihydrat (EDTA)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)- tetraessigsäure (EGTA)	Boehringer Mannheim, Mannheim
N-Ethylmaleinimid (NEM)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Faktor II-Mangelplasma	Immuno, Wien, Österreich
Fluorogene Substrate Boc-Val-Pro-Arg-AMC•HCl und Boc-Asp(Obzl)-Pro-Arg-AMC•HCl	Bachem, Heidelberg
Heparin	Immuno, Wien, Österreich
Humanes Normalplasma	Paul-Ehrlich-Institut, Langen,
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2- ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Iminodiessigsäure	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Iodacetamid	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Kaliumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Lithiumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Luminol	Amersham/Pharmacia biotech, Heidel- berg
Magnesiumchlorid, Hexahydrat	Merck KGaA, Darmstadt
Manganchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
2-Mercaptoethanol	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Methanol	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
N,N'-Methylenbisacrylamid	Merck KGaA, Darmstadt
Milchpulver	Merck KGaA, Darmstadt
Mono P	Pharmacia Biotech Europe GmbH, Frei- burg
2-[N-Morpholino]ethansulfonsäure (MES)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Natriumacetat	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck KGaA, Darmstadt
Nickelchlorid, Hexahydrat	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
p- Nitro-blue-tetrazolium (NBT)	Roche, Mannheim

<i>p</i> -Nitrophenylphosphat (pNPP)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Pefabloc SC	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Pepstatin A	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
o-Phenanthrolin	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Calbiochem, Bad Soden
Phospholipide (Rinderhirnextrakt)	Dade, München
Piperazin-N,N'-bis[2-ethansulfonsäure] (PIPES)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Polybuffer 74	Serva, Heidelberg
Poros QE 20	PE Biosystems, Weiterstadt
Q Sepharose FF	Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
Salzsäure, konzentriert	Merck KGaA, Darmstadt
Sephacryl S200	Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Trichloressigsäure (TCA)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Triton X-100	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Tween 20	Merck KGaA, Darmstadt
Wasserstoffperoxid	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Zinkchlorid	Merck KGaA, Darmstadt

2.1.5 Standards und Kits

DNA-Molekulargewichts-Marker 100bp-Leiter	Promega Corporation, Madison, WI, USA
DNA-Molekulargewichts-Marker 1kb-Leiter	Promega Corporation, Madison, WI, USA
DIG nucleic acid detection kit	Roche, Mannheim
Expand long template PCR-system	Roche, Mannheim
Genomic DNA Kit	Qiagen GmbH, Hilden

Micro BCA Protein Assay-Kit	Pierce, Rockford, IL, USA
PCR DIG probe synthesis kit	Roche, Mannheim
Prestained SDS-PAGE Standard, Low range	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
QIAquick gel extraction kit	Qiagen GmbH, Hilden
Qiagen Plasmid Kit Midi	Qiagen GmbH, Hilden
QIAprep Spin Plasmid Miniprep	Qiagen GmbH, Hilden
SDS-PAGE Standard, Low Range	Bio-Rad Laboratories GmbH, München

2.1.6 Geräte

Analysenwaage MC-1	Sartorius AG, Göttingen
Beckmann-Zentrifuge J-21C mit Rotor JA-10	Beckmann Instruments, München
Biometra BioDoc Controller und Kamera	Biometra GmbH, Göttingen
Brutschrank Cytoperm	Heraeus Christ GmbH, Osterode
Bunsenbrenner Labogaz 206	Camping gaz international, Paris, Frankreich
Elektrophoresekammer A 4287	Biometra GmbH, Göttingen
Elektrophoresekammer Mighty Small II SE 250	Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA
ELISA-Photometer Thermo-max	Molecular Devices, Sunnyvale, Ca, USA
Eppendorf Centrifuge 5415C	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Fluorescence reader Fluostar	SLT, Grailsheim
FPLC-System	Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
Heizrührer IKA-Combimag	Janke & Kunkel KG, Staufen im Breisgau
Kühl-Gefrier-Kombination glass line	Liebherr, Ochsenhausen
Leuchttisch Kaiser RS1	Laborgeräte Vetter GmbH, Wiesloch
Metallblockthermostat Eppendorf Thermomixer 5436	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Mikroprozessor-pH-Meter 761 Calimatic	Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co., Berlin

Multistepper Multipette plus	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Netzgerät Power Supply EPS 601	Amersham/Pharmacia biotech, Heidelberg
Peristaltische Pumpe P1	Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
Pipetten Gilson P20, P200, P1000	Gilson, Villiers-le-Bel, Frankreich
Pipettierhilfe Pipetus akku	Hirschmüller Laborgeräte, Eberstadt
Schnitger & Gross Koagulometer	Amelung, Lemgo
Schüttelapparat 3016	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
Schüttelgerät Vortex-Genie 2	Scientific Industries Inc., Bohemia, N.Y., USA
Schüttelinkubator G25	New Brunswick Scientific Co. Inc., Edison, N.J., USA
Schüttelinkubator Innova 4330	New Brunswick Scientific Co. Inc., Edison, N.J., USA
Sorvall RC 28S-Zentrifuge mit Rotor F-16/250 und F-28/50	DU PONT, Wilmington, USA
Speed Vac SC100	Savant Instruments Inc., Holbrook, NY, USA
Sterile Werkbank SterilCARD Hood Class II, Typ A/B3	the Baker Company, inc., Sanford, Maine, USA
Thermocycler UNO	Biometra GmbH, Göttingen
Tiefkühlschrank Ultra low freezer (-85°C)	New Brunswick Scientific Co. Inc., Edison, N.J., USA
Tischkühlzentrifuge Biofuge Fresco	Heraeus Christ GmbH, Osterode
Ultrafiltrationseinheit AMICON RA 2000	Amicon, Inc., Beverly, MA, USA
Video Graphic Printer Sony UP 890 CE	Sony Corporation, Shinagawa-ku, Tokyo, Japan
Video-Monitor Panasonic WV-BM900	Matsushita Electric Industrial Co., Ltd., Osaka, Japan
Wasserbad RCB 300	Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA

2.1.7 Sonstiges Material

Combitips, 0,5, 1, 2,5 und 5 ml	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Diaflo Hollow Fiber Cartridges	Amicon, Inc., Beverly, MA, USA
Mikrotiterplatten	Nunc, Wiesbaden, Deutschland
Petrischalen, Durchmesser 94 mm	Sarstedt GmbH, Nümbrecht
Reaktionsgefäße, 1,5 ml und 2 ml	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Säulen NAP5, NAP10, PD10	Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
Servapor Dialysesschläuche, Durchmesser 16 und 29 mm	Serva, Heidelberg
Sterilfilter 0,45 µm	Sarstedt GmbH, Nümbrecht
Transfermembran Immobilon-P (PVDF)	Millipore, Eschborn, Germany
Transfermembran Nitrozellulose	Schleicher & Schuell, Dassel
Zentrifugenbecher für Beckman-Rotor JA10	Nalgene Company, New York, USA
Zentrifugenbecher für Sorvall-Rotor F-16/250 und F-28/50	DU PONT, Willington, USA

2.1.8 Medien und allgemeine Lösungen

2×YT-Medium

16 g/l	Bacto Trypton
10 g/l	Bacto Yeast Extract
10 g/l	NaCl
15 g/l	Bacto Agar (nur für Kulturplatten)
mit NaOH auf pH 7,5 einstellen und autoklavieren	

LB-Medium

10 g/l Bacto Trypton
5 g/l Bacto Yeast Extract
5 g/l NaCl
15 g/l Bacto Agar (nur für Kulturplatten)
mit NaOH auf pH 7,5 einstellen und autoklavieren

CASO-Bouillon

17 g/l Pepton aus Casein
3 g/l Pepton aus Sojamehl
2,5 g/l Glucose
5 g/l Natriumchlorid
2,5 g/l di-Kaliumhydrogenphosphat

1 × BLOTTO:

5 % Trockenmilch
0,02 % Natriumazid

20 × SSC:

3 M NaCl
0,3 M Na-Citrat
mit NaOH auf pH 7,5 einstellen und autoklavieren

Tris-EDTA-Puffer (TE)

1 mM EDTA
10 mM Tris/HCl pH 8,0

Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE)

1 mM EDTA pH 8,0
20 mM Essigsäure
40 mM Tris

Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS-Puffer)

4 mM	KH_2PO_4
16 mM	Na_2HPO_4
115 mM	NaCl

PBST 0,1

PBS-Puffer mit 0,1 % v/v Tween 20

Lsg. A für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

30 %	Acrylamid
0,8 %	Bisacrylamid

in Wasser, sterilfiltrieren (0,45 µm)

Lsg. B für die SDS-PAGE

4 g/l	SDS
1,5 M	Tris/HCl pH 8,8

Lsg. C für die SDS-PAGE

4 g/l	SDS
0,5 M	Tris/HCl pH 6,8

4× Auftragspuffer für SDS-PAGE

12,5 ml	Lsg. C
0,5 mg	Bromphenolblau
2,5 ml	2-Mercaptoethanol
5 ml	Glycerin
1 g	Natriumdodecylsulfat (SDS)

ad 25 ml Wasser

4 × Laufpuffer für die SDS-PAGE

60,67 g	Tris
20 g	SDS
288 g	Glycin

ad 5 l Wasser

SDS-PAGE-Gel-Färbelösung

1,25 g	Coomassie Brilliant blau R250
50 ml	Essigsäure
250 ml	Methanol
250 ml	Wasser

SDS-PAGE-Gel-Entfärbelösung

10 % v/v	Essigsäure
40 % v/v	Methanol
50 % v/v	Wasser

10 × Auftragspuffer für Agarose-Gelelektrophorese

2 ml	50 × TAE-Puffer
25 mg	Bromphenolblau
5 ml	Glycerin
3 ml	Wasser
25 mg	Xylencyanol

Puffer A für die Chromatographie: 10 mM HEPES, pH 7,5

2,38 g	HEPES
--------	-------

ad 1 l Wasser, sterilfiltrieren (0,45 µm)

Puffer B für die Chromatographie: 10 mM HEPES, 300 mM NaCl, pH 7,5

2,38 g	HEPES
17,53 g	NaCl

ad 1 l Wasser, sterilfiltrieren (0,45 µm)

2.2 Molekularbiologische und mikrobiologische Methoden

2.2.1 Kultivierung und Konservierung von Bakterien

Durch Ausstreichen der Bakterien auf Agar-Medien und anschließende Inkubation über Nacht bei 37 °C wurden Einzelkolonien erhalten. Die mit Bakterienkolonien bewachsenen Kulturplatten wurden bis zu zwei Wochen bei 4 °C gelagert und zum Animpfen neuer Kulturen verwendet.

Flüssigkeitskulturen wurden in CASO-Bouillon oder LB-Medium angesetzt. Übernachtskulturen mit einem Volumen von 5 ml wurden in einem 50 ml-Kunststoffröhrchen, größere Kulturvolumina in einem Erlenmeyer-Kolben mit 2,5 fachem Kulturvolumen angezüchtet. Die Inkubation erfolgte bei 200 rpm und 25 °C oder 37 °C in einem Schüttelinkubator.

Kulturvolumina von bis zu 20 ml wurden direkt mit einer Einzelkolonie von der Agar-Platte angeimpft, größere Kulturen für präparative Produktionen im Verhältnis 1:50 mit einer stationären Übernachtskultur inokuliert. Zur Bestimmung der Zelldichte wurde die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen.

Zur Konservierung der Bakterien wurden Glycerinkulturen angelegt. Hierzu wurden 0,5 ml einer stationären Kultur mit 1 ml 87 % v/v Glycerin (steril) vermischt und bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.2 Gelelektrophorese von DNA

Doppelsträngige DNA-Fragmente wurden durch horizontale Agarose-Gelelektrophorese in Abhängigkeit von ihrem Molekulargewicht aufgetrennt (Sambrook et al., 1989).

2.2.2.1 Analytische Gelelektrophorese

Für die analytische Gelelektrophorese wurden 1 % w/v Agarose-Gele eingesetzt. 1 g Agarose wurde in 100 ml TAE-Puffer suspendiert und zum Sieden erhitzt. Die entstandene klare Lösung wurde nach dem Abkühlen mit 1/10000 Volumen Ethidiumbromidlösung (1 % w/v in Wasser) versetzt und in eine horizontale Gelkammer gegossen. Anschließend wurde der Geltaschenformer eingesetzt. Nach dem Erstarren wurde das Agarosegel in die mit TAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer hin-

einggelegt. Nach dem Entfernen des Taschenformers wurde das Gel pro Spur mit 10 µl DNA-Lösung, die 1/10 Volumen 10× Auftragspuffer enthielt, beladen. Die Elektrophorese erfolgte für 60 min bei konstant 60 Volt. Im Anschluss an die Gelelektrophorese wurden die aufgetrennten, mit Ethidiumbromid angefärbten DNA-Fragmente durch Bestrahlung mit UV-Licht einer Wellenlänge von 312 nm sichtbar gemacht und photographiert.

2.2.2 Präparative Gelelektrophorese und Isolierung von DNA-Fragmenten

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten wurde eine präparative Gelelektrophorese mit 0,7 % w/v Agarosegelen durchgeführt. 0,7 g Agarose wurden mit 100 ml TAE-Puffer zum Sieden erhitzt und nach dem Abkühlen mit 1/10000 Volumen Ethidiumbromidlösung (1 % w/v in Wasser) versetzt. Die Mischung wurde dann in die Gelform gegossen. Um Geltaschen zu erhalten, die groß genug waren, um den gesamten Restriktionsansatz nach Zugabe von 1/10 Volumen Auftragspuffer aufnehmen zu können, wurden spezielle Geltaschenformer verwendet. Bei diesen Geltaschenformern waren je drei Zähne des Kamms mit Klebeband zusammengeklebt, so daß eine ausreichend große Tasche gebildet werden konnte. Die Elektrophorese wurde für 60 min bei 60 Volt durchgeführt. Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurden die Genfragmente mit UV-Licht (312 nm) sichtbar gemacht. Mit einem Skalpell wurden die Gelstücke, die die zu isolierenden DNA-Fragmente enthielten, ausgeschnitten.

Die Isolierung und Reinigung der DNA-Fragmente aus den Agarosegelstücken erfolgte mit dem QIAquick gel extraction Kit der Firma QIAGEN nach dem Protokoll des Herstellers. Die isolierten Genfragmente wurden bei –20°C gelagert.

2.2.3 Enzymatische Spaltung von DNA

Zur Präparation von Genfragmenten wurde chromosomale DNA mit Restriktionsendonukleasen gespalten. Diese enzymatischen Reaktionen wurden in dem vom Hersteller empfohlenen Puffersystem durchgeführt, wobei die Puffer als 10fach konzentrierte Stammlösungen den Ansätzen zugesetzt wurden. Bei Reaktionsansätzen mit einer Restriktionsendonuklease wurden Pufferbedingungen gewählt, bei denen das jeweilige Enzym maximale Aktivität zeigte. Bei Restriktionsspaltungen mit zwei En-

zymen wurde ein Puffer eingesetzt, in dem beide Enzyme die relativ höchste Aktivität aufwiesen. Dem Reaktionsansatz wurden außerdem 100 µg/ml BSA zugegeben.

Für Spaltungen im analytischen Maßstab erfolgte die Inkubation von ca. 0,5 – 1 µg DNA mit jeweils 5 U eines Restriktionsenzym in einem Gesamtvolumen von 20 µl für 2 h bei der vom Hersteller empfohlenen Temperatur.

Präparative Spaltungen wurden mit ca. 5 µg DNA und 20 U der Restriktionsendonuklease in einem Reaktionsvolumen von 50 µl durchgeführt. Das Gemisch wurde hierbei 2 h lang bei der vom Hersteller empfohlenen Temperatur inkubiert.

2.2.4 Ligierung von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente, die nach einer Spaltung chromosomaler DNA mit Restriktionsendonukleasen und anschließender elektrophoretischer Auftrennung erhalten worden waren, wurden unter Katalyse von T4-DNA-Ligase intra- bzw. intermolekular kovalent verknüpft. Um die Zirkularisierung einzelner Fragmente zu begünstigen, wurden die Spaltprodukte stark verdünnt eingesetzt.

Für die Ligierung wurden 1,5 U T4-DNA-Ligase (NEB) und 1 µl DNA-Fragmentlösung in einem Gesamtvolumen von 20 µl eingesetzt. Die Reaktion wurde für 48 h bei 15 °C in einem vom Hersteller empfohlenen Puffer durchgeführt.

2.2.5 Isolierung chromosomaler DNA aus *Aeromonas hydrophila*

Ausgehend von 5 ml einer stationären Übernachtskultur erfolgte die Isolierung chromosomaler DNA mit Hilfe des Genomic DNA Kit nach dem Protokoll des Herstellers QIAGEN. Die DNA wurde mit 50 µl Wasser eluiert und bei 4 °C gelagert.

Die isolierte chromosomale DNA wurde direkt für analytische oder präparative Spaltung durch Restriktionsendonukleasen, für Sequenzierungsreaktionen und für die Polymerase-Kettenreaktion eingesetzt.

2.2.6 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung erfolgte nach dem Kettenabbruchverfahren von Sanger et al. (1977). Als Ausgangspunkt dienten isolierte chromosomale DNA aus *Aeromonas hydrophila* oder PCR-Produkte.

Die Sequenzierungen wurden freundlicherweise von Herrn Martin Selbert (Paul-Ehrlich-Institut) durchgeführt.

2.2.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde mit dem Expand long template PCR-Kit der Firma Roche (Mannheim) nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Ausgangspunkt war isolierte DNA von *Aeromonas hydrophila* (Kap. 2.2.5).

Die Reaktion wurde in einem Thermocycler (Biometra, Göttingen) durchgeführt. In einem PCR-Reaktionsgefäß wurden pro Ansatz 17 µl Wasser mit 2,5 µl 10 × PCR-Puffer, 2,5 µl dNTP-Lösung (je 2,5 mM), 1 µl Probenmaterial und je 0,5 µl der beiden Primer (je 50 µM) versetzt.

10 × PCR-Puffer:	500 mM	KCl
	100 mM	Tris-HCl, pH 8,3 bei 21°C
	17,5 mM	MgCl ₂
	0,1%	Gelatine

Der Ansatz wurde mit 20 µl Paraffinöl überschichtet, um ein Verdunsten der Lösung zu verhindern. Die Proben wurden zunächst für 3 Minuten bei 94°C denaturiert. Währenddessen erfolgte der Reaktionsstart durch die Zugabe von 1 µl eines 16:1 *Taq-/Pfu*-DNA-Polymerase-Gemisches (3,5 U/µl), das eine hohe Genauigkeit der Reaktion und die Amplifikation sehr langer DNA-Bereiche ermöglicht (Barnes, 1994). Das Gesamtvolumen pro Reaktionsansatz betrug 25 µl.

Der erste Zyklus wurde wie folgt durchgeführt:

Denaturierung:	20 Sekunden	94°C
Annealing:	30 Sekunden	51-56°C (primerspezifisch)
Polymerisation:	3-8 Minuten	72°C

Der erste Zyklus wurde insgesamt 34 mal wiederholt. Die erhaltenen PCR-Fragmente wurden mittels Gelelektrophorese analysiert (Kap. 2.2.2.1) beziehungsweise durch präparative Gelelektrophorese (Kap. 2.2.2.2) bei Bedarf gereinigt. Anschließend wurden sie für Sequenzierreaktionen eingesetzt (Kap. 2.2.6)

2.2.8 Herstellung einer biotinylierten Gensonde

Zum spezifischen Nachweis von Genfragmenten nach der elektrophoretischen Auftrennung und dem Transfer auf eine Nitrozellulosemembran im Rahmen von Southern-Blot-Untersuchungen (Kap. 2.2.9), wurden biotinylierte DNA-Sonden eingesetzt. Diese wurden mit Hilfe des PCR DIG probe synthesis kit (Roche, Mannheim) nach dem Herstellerprotokoll durch Polymerase-Kettenreaktion (Kap. 2.2.7) synthetisiert. Neben den beiden Primern in einer Endkonzentration von jeweils 1 μM und 10 ng *Aeromonas hydrophila*-DNA enthielt der Reaktionsansatz 200 μM dATP, dCTP, dGTP, 130 μM dTTP und 70 μM biotinyliertes dUTP.

Die Reinigung der Sonde erfolgte durch elektrophoretische Auftrennung des Reaktionsansatzes auf einem Agarosegel, Ausschneiden der betreffenden Bande und Gelextraktion (Kap. 2.2.2.2).

2.2.9 Southern-Blot-Analyse

2.2.9.1 Kapillartransfer von DNA auf Nitrozellulose

Für den Transfer von DNA aus denaturierenden Agarosegelen (2.2.3.1) wurde nach der Methode von Sambrook et al. (1989) vorgegangen. Als Transferpuffer wurde 20 \times SSC (3 M NaCl, 0,3 M Na-Citrat, pH 7,0) eingesetzt. Der Kapillartransfer auf die Nitrozellulose-Membran wurde 18 Stunden lang durchgeführt und die noch feuchte Membran anschließend für 2 Stunden auf 80°C erhitzt, um die Nukleinsäuren auf der Membran zu fixieren.

2.2.9.2 Hybridisierung von Nukleinsäuren auf Transfer-Membran

Die Hybridisierung wurde nach der Methode von Sambrook et al. (1989) durchgeführt.

Hybridisierungslösung: 6 \times SSC

0,05 \times BLOTTO

1. Prähybridisierung: Die Transfermembran wurde luftblasenfrei in eine Polyethylenfolie eingeschweißt. Auf 100 cm² Membranfläche wurden 10 ml Hybridisierungslösung eingesetzt. Die Inkubationszeit bei 68°C betrug 2 Stunden.

2. Hybridisierung: Die Lösung wurde nach der Prähybridisierung erneuert und 100 ng einer biotinylierten Gensonde (Kap. 2.2.8) in 10 ml Hybridisierungslösung zugegeben. Die Inkubation erfolgte 10 Stunden lang bei 68°C.
3. Waschen: Die Membran wurde nacheinander je 30 min lang gewaschen mit $2 \times$ SSC mit 0,5 % SDS, $2 \times$ SSC mit 0,1 % SDS, $0,1 \times$ SSC mit 0,5 % SDS und $0,1 \times$ SSC. Anschließend erfolgte das Trocknen zwischen Papiertüchern.

2.2.9.3 Immunologische Detektion über hybridisierte Gensonden

Die immunologische Detektion der hybridisierten Gensonde erfolgte mit Hilfe des DIG nucleic acid detection kit (Roche, Mannheim) nach dem Protokoll des Herstellers.

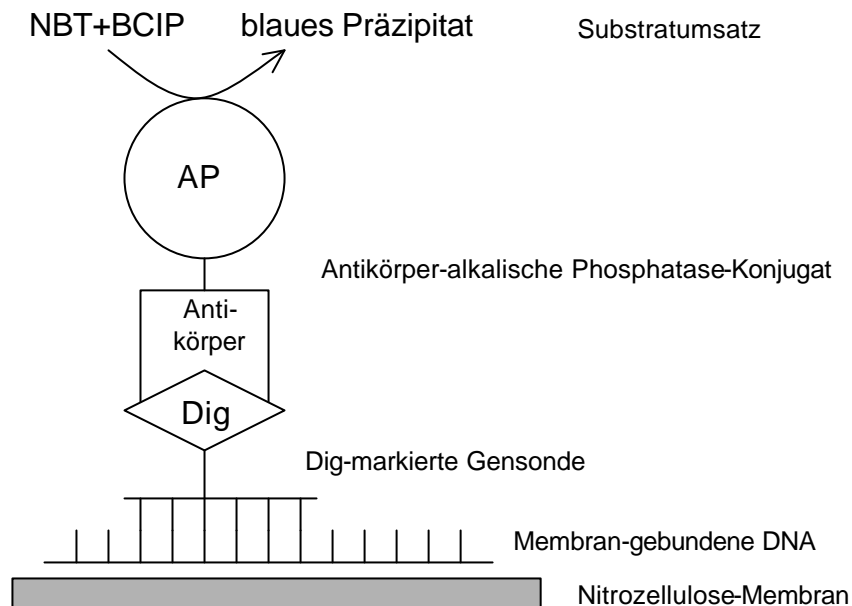


Abbildung 6: schematische Darstellung der immunologischen Nachweisfärbung mit Digoxigenin-markierten Sonden.

Die Membran wurde zunächst 10 Minuten lang gewaschen mit 0,1 M Maleinsäure, 0,15 M NaCl, 0,3 % (v/v) Tween 20, pH7,5 und anschließend mit 100 ml einer Blockierlösung (1 % Blockierungsreagenz in 0,1 M Maleinsäure, 0,15 M NaCl, pH7,5) für 30 Minuten inkubiert. Danach wurde sie 30 Minuten lang in 20 ml einer Antikörperlösung (150 mU/ml Anti-DIG-alkalische Phosphatase-Konjugat in Blockierungslösung) geschwenkt und schließlich zweimal für je 15 Minuten mit je 100 ml 0,1 M Maleinsäure, 0,15 M NaCl, 0,3 % (v/v) Tween 20, pH7,5 gewaschen. Nach dem Äquilibrieren mit 20 ml Detektionspuffer (0,1 M Tris-HCl, 0,1 M NaCl, pH 9,5) für 10 Minuten wurde

die Membran mit 10 ml Farbsubstratlösung (0,375 mg/ml NBT, 0,188 mg/ml BCIP in Detektionspuffer) versetzt.

Die Farbpräzipitate bildeten sich nach wenigen Minuten. Sobald die Signale deutlich erkennbar waren, wurde die Reaktion in destilliertem Wasser gestoppt.

Die Membran wurde danach zwischen Papiertüchern getrocknet.

Abbildung 6 zeigt schematisch den Aufbau des immunologischen Nachweises von Digoxigenin-markierten Sonden.

2.3 Proteinchemische Methoden

2.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen in Abhängigkeit von ihrem Molekulargewicht erfolgte durch diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970).

Proteingemische wurden in 12,5 %igen Trenngelen mit den Abmessungen $8,5 \times 5,5$ cm und einer Geldicke von 1,5 mm aufgetrennt. Die Gelkammer wurde durch Zusammenheften zweier gereinigter Glasplatten ($8 \text{ cm} \times 10 \text{ cm}$) über Abstandshalter (1,5 mm Dicke) mittels Klammern erhalten. Nach dem Abdichten der Gelkammer mit 1 % w/v geschmolzener Agarose wurden 7,2 ml einer flüssigen Trenngelmischung eingefüllt. Zur Herstellung der Trenngelmischung wurden 3,2 ml Lösung A, 2,5 ml Wasser und 1,9 ml Lösung C vermischt. Durch Zugabe von 75 μl 10 % w/v APS-Lösung und 5 μl TEMED wurde die Polymerisation ausgelöst. Anschließend wurde mit 1 ml Isopropanol überschichtet, um den Kontakt mit Luft auszuschließen und eine gleichmäßige Trenngelgrenzfläche zu erhalten.

Nach der Polymerisation des Trenngels wurde das Isopropanol entfernt und eine polymerisierende Sammelgellösung eingefüllt, die durch das Vermischen von 2,9 ml Wasser, 1,25 ml Lösung C und 830 μl Lösung A erhalten wurde. Der Polymerisationsstart erfolgte durch Zugabe von 40 μl 10 % w/v APS-Lösung und 6 μl TEMED. Danach wurde ein Taschenformer eingesetzt. Nach der Polymerisation des Sammelgels wurde das Gel in die Laufkammer eingespannt und der Laufpuffer eingefüllt.

Je 30 μl der Proteinproben wurden mit 10 μl $4 \times$ SDS-Auftragspuffer vermischt und zur Denaturierung der Proteine für 5 min auf 95 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen auf

Eis und einer kurzen Zentrifugation wurden die Proben auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei einer maximalen Stromstärke von 30 mA und einer maximalen Spannung von 120 mV ca. 80 min lang betrieben, bis der Bromphenolblau-Marker aus dem Gel herausgelaufen war. Die Proteinbanden wurden durch Schwenken des Trenngels in einer SDS-PAGE-Gel-Färbelösung angefärbt und durch anschließende Entfärbung des Hintergrunds mit einer SDS-PAGE-Gel-Entfärbelösung sichtbar gemacht. Das Gel wurde photographiert und in Wasser bei 4°C gelagert.

2.3.2 Western-Blot-Analyse

Proteingemische lassen sich nach einer Auftrennung durch diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Abschnitt 2.3.1) durch Elektrotransfer auf einen Membranfilter überführen.

Zum Nachweis von Proteinen, die auf der Membran fixiert waren, wurde diese zur Absättigung zunächst in 1% Magermilch in PBST 0,1 geschwenkt. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit Antikörpern, die gegen das betreffende Protein gerichtet waren. Nach dem Waschen der Membran mit PBST 0,1 wurde mit einem Protein G-Peroxidase-Konjugat inkubiert. Als nächstes wurden die Peroxidase-Substrate 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) und Wasserstoffperoxid zugegeben. Bei der von der Peroxidase katalysierten Redoxreaktion bildete sich auf der Membran ein braunes Präzipitat, anhand dessen die Zielproteine detektiert werden konnten.

Für eine selektive Detektion aktiver Proteasen wurden die Reaktionsprodukte der Prothrombin-Aktivierung vor Durchführung der SDS-PAGE und des Elektrotransfers auf einen Membranfilter mit dem biotinylierten Serin-Proteaseinhibitor D-Phe-Pro-Arg-chloromethylketon (PPACK) inkubiert, der eine kovalente Bindung mit dem Histidin-Rest des aktiven Zentrums bildet (Abbildung 7). Nach dem Waschen der Membran mit PBST 0,1 erfolgte der Nachweis der biotinylierten Proteine über ein Avidin-Peroxidase-Konjugat, das an den eingeführten Biotin-Rest assoziierte und über die oben erwähnte Farbreaktion zwischen 3,3'-Diaminobenzidin und Wasserstoffperoxid.

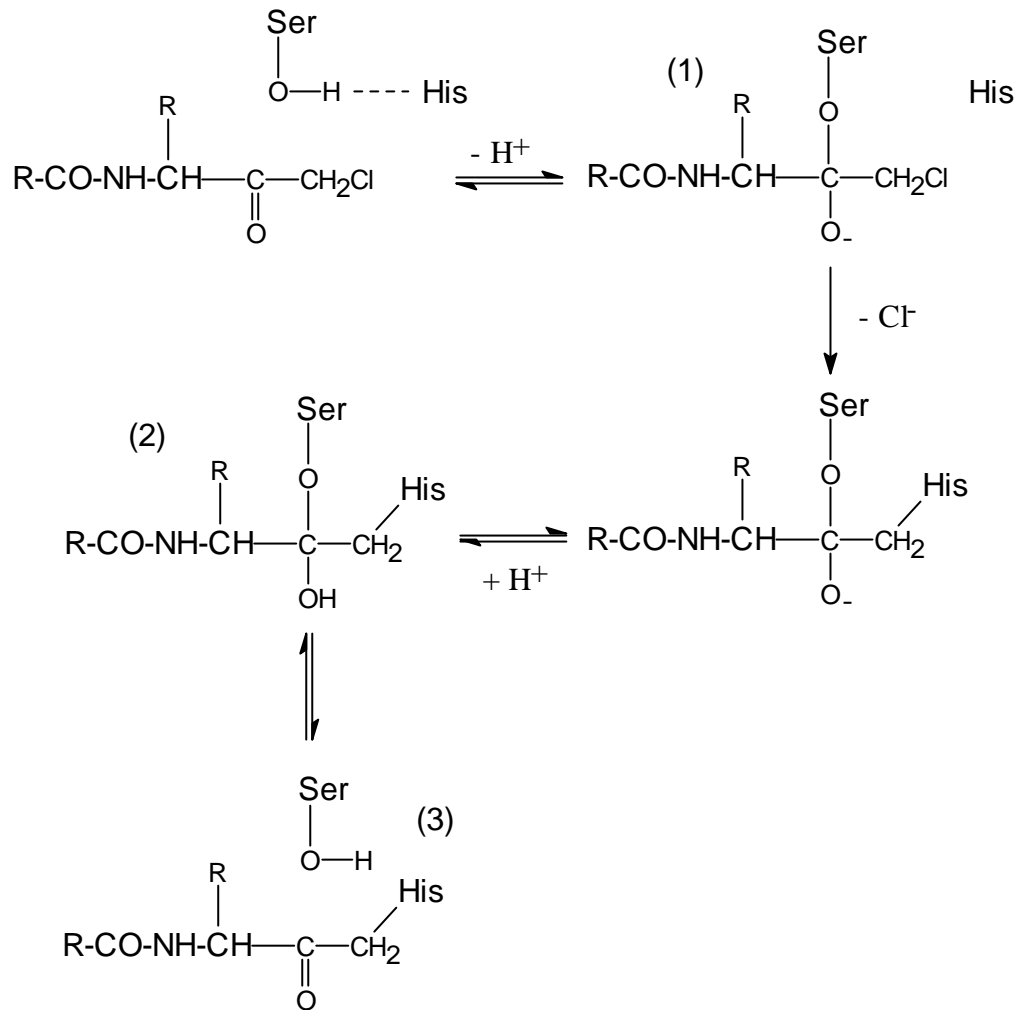


Abbildung 7: Mechanismus der Inaktivierung von Serin-Proteasen durch Peptid-chloromethylketone (Powers et al., 1977).

Nach Erkennung des Peptid-Anteils durch das Enzym, erfolgt ein nukleophiler Angriff der Hydroxyl-Gruppe des Serin-Restes im aktiven Zentrum an dem positiv polarisierten Carbonyl-Kohlenstoffatom des Inhibitors unter Ausbildung des tetraedrischen Hemiketals (1). Im nächsten Schritt erfolgt die N-Alkylierung des Histidin-Restes im aktiven Zentrum durch einen nukleophilen Angriff des N-Atoms des Imidazolrings am C-Atom der Chloromethylgruppe unter Austritt des Chlorid-Ions als Abgangsgruppe. Nach Protonierung kann die entstandene Zwischenstufe (2) zerfallen unter Regenerierung des Serin-Restes und der Carbonyl-Gruppe (3).

Zur Durchführung des Elektrottransfers wurden zwei Blatt Whatman-Filterpapiere (8,5 × 5 cm) in Laufpuffer mit 20 % v/v Methanol (Blot-Puffer) getränkt. Währenddessen wurde die PVDF-Membran zurechtgeschnitten, dann 5 Minuten in 100% Methanol getaucht und schließlich 10 Minuten im Blotpuffer äquilibriert. Trenngel und Membran wurden in Sandwich-Technik zwischen die beiden Whatman-Filterpapiere luftblasen-

frei in die Transferapparatur eingespannt. Der Transfer erfolgte in Blotpuffer 2 Stunden lang bei 300 mA.

Die Nitrozellulose-Membran wurde nach dem Elektotransfer 4× für je 10 min in einer Blockierlösung (1% Magermilch in PBST 0,1) geschwenkt, um unspezifische Bindung von Proteinen abzuschwächen.

Zum Nachweis biotinylierter Proteinderivate erfolgte eine 60minütige Inkubation mit 10 µl ExtrAvidin-Peroxidase-Konjugat in 10 ml PBST 0,1. Danach wurde die Membran zweimal mit PBST 0,1 gewaschen und zum Anfärben mit 20 ml PBS versetzt, die 10 mg 3,3'-Diaminobenzidin und 30 µl Wasserstoffperoxid (30%) enthielten. Sobald die erwünschte Bandenintensität erreicht war, wurde die Färbereaktion durch mehrfaches Spülen mit entionisiertem Wasser abgebrochen und die Membran anschließend zwischen Filterpapieren getrocknet.

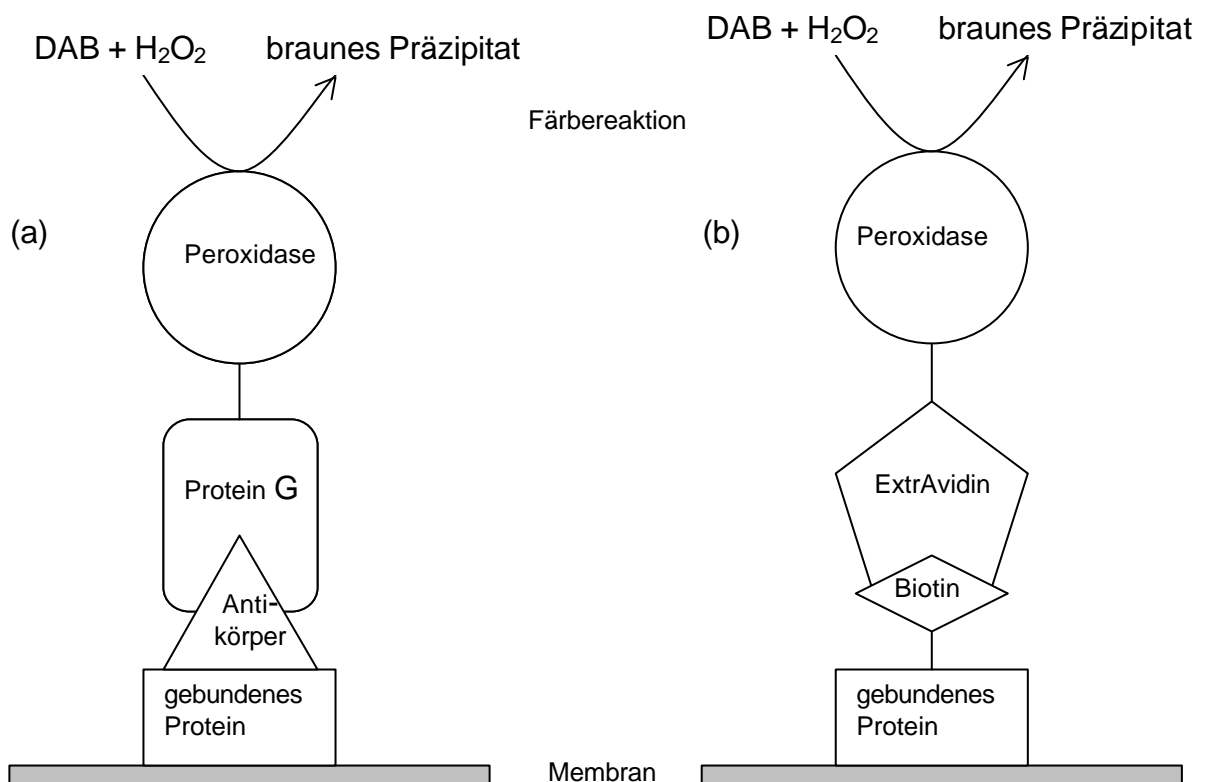


Abbildung 8: schematischer Aufbau der Western-Blots zum Nachweis von Proteinen ohne (a) bzw. mit (b) eingeführtem Affinitätsanhängsel Biotin.

Für den Nachweis anderer Proteine wurde die Membran nach dem Elektrotransfer und dem Blockieren mit einer 1 %igen Magermilchlösung in PBST 0,1 zweimal mit PBST 0,1 gewaschen. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 1 Stunde mit 10 ml

einer in PBS verdünnten Lösung der gegen das Zielprotein gerichteten Antikörper. Nach zweimaligem Waschen mit PBST 0,1 wurde die Membran 60 Minuten lang in einer Lösung aus 10 µl Protein G-Peroxidase-Konjugat in 10 ml PBST 0,1 geschwenkt und dann erneut zweimal mit PBST 0,1 gewaschen. Zum Schluss wurde die Färbereaktion wie oben beschrieben durchgeführt und beendet. In einigen Fällen wurde zur sensitiveren Detektion Luminol eingesetzt.

Der schematische Aufbau der Western-Blots zur Detektion biotinylierter bzw. nicht-makterter Proteine ist in Abbildung 8 dargestellt.

2.3.3 Elektrotransfer zur Proteinsequenzierung

Der Elektrotransfer von Proteinen zur Proteinsequenzierung erfolgte in Anlehnung an die von Matsudaira (1989) beschriebene Methode auf Polyvinylidenfluoridmembranen. Der Elektrotransfer wurde wie in Abschnitt 2.3.2 beschrieben durchgeführt. Anschließend wurde die Membran dreimal für je 5 Minuten mit Wasser gewaschen und die transferierten Proteine durch Färbung mit Coomassie sichtbar gemacht.

Färbung:	10% (v/v) Eisessig	5 Minuten
	50% (v/v) Methanol	
	0.1% (w/v) Coomassie Blue R250	
Entfärbung:	10% (v/v) Eisessig	
	50 % (v/v) Methanol	

Nach dem Entfärben des Hintergrunds wurde die Membran mehrfach mit PBS gewaschen und anschließend getrocknet. Die betreffenden Proteinbanden wurden ausgeschnitten und zur N-terminalen Sequenzierung eingesetzt (Kap. 2.3.4).

2.3.4 Aminoterminal Sequenzanalysen

Die Bestimmung der Aminosäuresequenz am aminoterminalen Ende von Proteinen erfolgte nach der Methode von Edman (1975). Der automatisierte Edman-Abbau mit einem Amino Acid Sequencer Procise 492, verbunden mit einem Online PTH-Analyzer 140C und dem UV Detektor 785A (PE Biosystems, Weiterstadt), wurde von Frau Dr. Wolf (Technische Universität Darmstadt) durchgeführt.

2.3.5 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

2.3.5.1 Absorptionsmessung von Proteinlösungen

Die spektralphotometrische Bestimmung von Proteinkonzentrationen erfolgte durch Absorptionsmessung (Petersen, 1983) bei einer Wellenlänge von 280 nm nach folgender Näherungsformel:

$$1 A_{280}\text{-Einheit entspricht } 1 \text{ mg/ml Protein}$$

2.3.5.2 Bestimmung der Proteinkonzentration mit Bicinchoninsäure

Der BCA-Test (Schoel et al., 1995) wurde mit Hilfe des Micro BCA Protein Assay-Kits der Firma Pierce (Rockford, USA) nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die Arbeitslösung aus 6,25 ml Reagenz A, 6 ml Reagenz B und 0,25 ml Reagenz C wurde frisch vor Gebrauch angesetzt.

Zur Messung der Absorption wurden 300 µl Proteinprobe mit einer geschätzten Konzentration von 5 – 30 µg/ml in einem Eppendorfgefäß mit 300 µl Arbeitslösung gemischt und 60 min lang bei 60°C inkubiert. Die photometrische Messung der Proben erfolgte in Mikrotiterplatten mit Hilfe eines ELISA-Photometers bei einer Wellenlänge von 560 nm und einer Temperatur von 25°C. Als Referenz diente eine BSA-Eichreihe, die ausgehend von einem Konzentrationsstandard durch Verdünnung erstellt wurde.

2.3.6 Produktion des Prothrombin-Aktivators im analytischen Maßstab

Zur Produktion des Prothrombin-Aktivators im analytischen Maßstab wurden 5 ml CASO-Bouillon mit einer Einzelkolonie *Aeromonas hydrophila* angeimpft und über Nacht bei 25 °C und 200 rpm im Schüttelinkubator kultiviert. 50 ml CASO-Bouillon wurden im Verhältnis 1 : 50 mit der stationären Übernachtskultur inokuliert und bei 25 °C und 200 rpm 24 Stunden lang inkubiert. Der Kultur wurden zu verschiedenen Inkubationszeiten Proben für Proteinbestimmungen (Kapitel 2.3.5), Aktivitätstests (Kapitel 2.3.10) und zur Bestimmung der optischen Dichte (600 nm) entnommen.

2.3.7 Produktion im präparativen Maßstab

5 ml CASO-Bouillon wurden mit einer Einzelkolonie inokuliert und über Nacht bei 25 °C und 200 rpm inkubiert. Danach wurden 100 ml CASO-Bouillon mit 2 ml der stationären Übernachtskultur angeimpft und in einem Schüttelinkubator über Nacht kultiviert. 8 Liter CASO-Bouillon wurden im Verhältnis 1:100 mit der Übernachtskultur angeimpft und 5 Tage lang bei 25 °C und 200 rpm geschüttelt. Das Kulturmedium wurde anschließend durch Zentrifugation in einer Beckman J21C-Zentrifuge von Zellen beziehungsweise Zelltrümmern abgetrennt. Die Zentrifugation wurde 20 Minuten lang bei 4°C und 6000 rpm in einem JA10-Rotor durchgeführt. Die erhaltenen 8 Liter zellfreies Kulturmedium wurden zur chromatographischen Reinigung des Prothrombin-Aktivators eingesetzt.

2.3.8 Säulenchromatographische Reinigung des Prothrombin-Aktivators

Zur Reinigung des Prothrombin-Aktivators aus einer *Aeromonas hydrophila*-Massenkultur wurden säulenchromatographische Methoden eingesetzt. Alle Chromatographieschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Die mit A und B bezeichneten Chromatographiepuffer wurden vor Gebrauch durch ein Membranfilter (0,45 µm) sterilfiltriert. Die Proteinkonzentration in den Chromatographiefraktionen wurde durch Messung der Absorption bei 280 nm (Kap. 2.3.5.1) verfolgt. Die Detektion des Prothrombin-Aktivators in den Fraktionen erfolgte über den in Kapitel 2.3.10.1 beschriebenen Aktivitätstest mit chromogenem Substrat. Proteinlösungen wurden entweder bei 4°C oder bei –20°C gelagert.

2.3.8.1 Probenvorbereitung für die chromatographische Reinigung

Zur Konzentrierung des Probevolumens und zur Abtrennung niedermolekularer Peptide der CASO-Bouillon wurden die 8 Liter Kulturmedium der *Aeromonas hydrophila*-Kultur mittels Ultrafiltration auf 300 ml eingeeengt. Die Ultrafiltration erfolgte mit der Ultrafiltrationseinheit AMICON RA 2000 und Hohlfaser-Kartuschen mit einer Ausschlußgrenze von 10 kDa. Um das Probenvolumen für die nachfolgende Anionenaustauscherchromatographie noch weiter zu reduzieren, wurden 454 g/l Ammoniumsulfat unter Rühren zugegeben, was einer 66%igen Ammoniumsulfat-Sättigung entspricht. Das Gemisch wurde anschließend gleichmäßig auf Zentrifugationsbecher

verteilt und die Proteinfällung über Nacht bei 4°C durchgeführt. Zur Sedimentation der gefällten Proteine erfolgte eine Zentrifugation in einer Sorvall RC 28S Zentrifuge für 45 Minuten bei 10000 rpm mit einem F28/50-Rotor. Nach Abtrennung des Überstandes durch Dekantieren wurden die sedimentierten Proteine in 20 ml Puffer A (10 mM HEPES, pH 7,5) aufgenommen.

Zur Entfernung der Ammoniumsulfat-Reste wurde die Probe dreimal für mindestens 10 Stunden gegen einen hundertfachen Überschuß von Puffer A bei Raumtemperatur dialysiert. Vor dem Gebrauch wurden die Dialyseschläuche 10 min lang bei 90°C in einer 1 mM EDTA-Lösung erhitzt. Anschließend wurde die Probe sterilfiltriert (0,45 µm).

2.3.8.2 Anionentauscherchromatographie mit Q Sepharose FF

Für die Anionentauscherchromatographie wurde eine 15 ml Säule mit Q Sepharose FF eingesetzt, die mit einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min betrieben wurde. Nach dem Äquilibrieren der Säule mit dem 5-fachen Säulenvolumen Puffer A erfolgte der Probenauftrag. Anschließend wurde mit dem 5-fachen Säulenvolumen Puffer A gewaschen. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte mit einem linearen Gradienten von 0 bis 300 mM NaCl in Puffer A. Es wurden 7 ml-Fractionen gesammelt.

Die Fractionen maximaler enzymatischer Aktivität wurden vereinigt und für die nachfolgende Chromatographie an Benzamidin-Sepharose dreimal für mindestens 10 Stunden gegen einen hundertfachen Überschuß von Puffer A bei Raumtemperatur dialysiert. Danach wurde das Dialysat durch einen Membranfilter (0,45 µm) sterilfiltriert.

Das Säulenmaterial wurde mit 1 M NaCl regeneriert und in PBS mit 0,02% Natriumazid bei 4°C gelagert.

2.3.8.3 Chromatographie mit Benzamidin-Sepharose

Der nächste Reinigungsschritt erfolgte mit einer 8 ml Benzamidin-Sepharose Säule. Die Fließgeschwindigkeit betrug 0,5 ml/min. Nach dem Äquilibrieren der Säule mit dem 5-fachen Säulenvolumen an Puffer A wurde die Probe aufgetragen. Anschließend wurde mit dem 5-fachen Säulenvolumen Puffer A gewaschen. Die Elution der

gebundenen Proteine erfolgte mit einem linearen Gradienten von 0 bis 300 mM NaCl in Puffer A. Das Eluat wurde in 1,5 ml-Fractionen gesammelt.

Die Fractionen mit der höchsten Prothrombin aktivierenden Aktivität wurden vereinigt und für die nachfolgende Konzentrierung am Anionentauscher viermal für mindestens 10 Stunden gegen einen hundertfachen Überschuß von Puffer A bei Raumtemperatur dialysiert und dann sterilfiltriert (0,45 µm).

Die Benzamidin-Sepharose-Säule wurde mit 5 M NaCl regeneriert. Die Lagerung erfolgte in PBS mit 0,02 % Natriumazid.

2.3.8.4 Konzentrieren mit Anionentauscher Poros 20 QE

Zum Konzentrieren der Proteinlösung nach der Benzamidin-Sepharose Chromatographie wurde eine 1,8 ml Säule Poros 20 QE eingesetzt. Diese wurde zunächst mit dem 5-fachen Säulenvolumen Puffer A bei einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min äquilibriert. Danach wurde die Proteinlösung aufgetragen, die Säule mit dem 10-fachen Säulenvolumen Puffer A gewaschen und anschließend die Fließrichtung umgedreht. Die Elution gebundener Proteine erfolgte über eine Stufenelution mit 1 M NaCl in Puffer A bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,2 ml/min. Das Eluat wurde in 0,5 ml-Fractionen aufgefangen. Die Fractionen, die Prothrombin-aktivierende Aktivität enthielten, wurden vereinigt und für die nachfolgende Gelpermeationschromatographie eingesetzt.

Die Säule wurde mit 5 M NaCl regeneriert und in PBS mit 0,02 % Natriumazid gelagert.

2.3.8.5 Gelpermeationschromatographie an Sephacryl S-200

Im abschließenden Reinigungsschritt wurde eine Gelpermeationschromatographie mit dem Säulenmaterial Sephacryl S-200 (Superfine) durchgeführt. Die Säule hatte ein Volumen von 600 ml und wurde mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,4 ml/min betrieben. Nach dem Äquilibrieren mit 2 l Puffer B (10 mM HEPES, 300 mM NaCl, pH7,5) wurde die Probe (1 ml) aufgetragen. Die Elution erfolgte mit Puffer B und der oben angegebenen Fließgeschwindigkeit. Das Eluat wurde in 8 ml-Fractionen gesammelt. Die Trenneigenschaften der Säule wurden mit einem Standardproteingemisch zur Gelpermeationschromatographie (Tab. 1) überprüft.

Die Aufbewahrung des Säulenmaterials erfolgte in PBS mit 0,02 % Natriumazid.

Protein	Molekulargewicht [kDa]
β-Amylase (Süßkartoffel)	200
Serumalbumin (Rind)	66
Carboanhydrase (Rind)	29
Cytochrom C (Pferd)	12,4

Tabelle1: Gelfiltrationsstandard

2.3.9 Chromatofokussierung

Zur Bestimmung des isoelektrischen Punktes des Prothrombin-Aktivators wurde eine Chromatofokussierung mit einer Mono P-Säule durchgeführt, die ein Volumen von 5 ml aufwies. Eingesetzt wurden die folgenden Puffersysteme:

Puffer C:

25 mM BIS-TRIS

5 % (w/v) Betain

mit Iminodiessigsäure ad pH 7

Puffer D:

10 ml Polybuffer 74

90 ml Wasser

5 % (w/v) Betain

mit Iminodiessigsäure ad pH 4

Die Mono P-Säule wurde mit dem 5-fachen Säulenvolumen Puffer C äquilibriert und anschließend die Probe (50 µg gereinigter Prothrombin-Aktivator in 1 ml Puffer C) aufgetragen. Die Fließgeschwindigkeit betrug 0,5 ml/min. Nach dem Waschen der Säule mit dem 5-fachen Säulenvolumen Puffer C erfolgte die Elution des gebundenen Enzyms durch das Anlegen eines pH-Gradienten von 7 bis 4 mit 25 ml Puffer D. Der Prothrombin-Aktivator wurde bei einem pH-Wert eluiert, der seinem isoelektrischen Punkt entsprach, da das Protein aufgrund seiner dann vorliegenden Nettoladung von Null nicht mehr an die positiv geladene Säulenmatrix binden konnte. Das Eluat wurde in 500 µl-Fractionen aufgefangen und der pH-Wert gemessen. Die Loka-

lisierung des Prothrombin-Aktivators in den erhaltenen Chromatographiefraktionen erfolgte über den in Kapitel 2.3.10.1 beschriebenen Aktivitätstest.

2.3.10 Messung der Aktivierung von Prothrombin

Die Messung der Aktivierung von Prothrombin durch das bakterielle Enzym erfolgte über die Spaltung eines chromogenen bzw. fluorogenen Substrates durch die enzymatisch aktiven Prothrombin-Spaltprodukte.

Es wurden ein- oder zweistufige Aktivitätstests durchgeführt.

2.3.10.1 einstufiger Aktivitätstest

Für die chromogene Messung der Prothrombin-Aktivierung wurde die Probe in den Vertiefungen einer Mikrotiterplatte auf 50 μ l mit 20 mM MES (2-[N-Morpholino]ethansulfonsäure)-Puffer (pH 6) verdünnt. Danach wurden 50 μ l einer Lösung zugegeben, die Prothrombin und das chromogene Substrat S-2238 für Thrombin enthielten. Bezogen auf den gesamten Reaktionsansatz stellte sich eine Prothrombin-Konzentration von 1 μ M und eine Konzentration des Substrates S-2238 von 1 mM ein.

Die Freisetzung des gelben Farbstoffes para-Nitroanilin im Verlauf der Reaktion (Abbildung 9) durch das gebildete Thrombin wurde über die Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 405 nm in Abhängigkeit von der Zeit verfolgt. Als Messparameter wurde die Steigung der erhaltenen Kurve ermittelt. In Kontrollexperimenten ersetzten ECV (Positivkontrolle) oder Puffer (Negativkontrolle) die Probe. Der Test wurde bei 37°C durchgeführt.

Die enzymatische Aktivität des Prothrombin-Aktivators wurde darüber hinaus in einem analog aufgebauten fluorogenen Aktivitätstest mit einem Fluoreszenzdetektor (Fluostar, SLT, Grailsheim) gemessen. In diesem Fall ersetzte das fluorogene Substrat Boc-Val-Pro-Arg-AMC das chromogene. Die Anregung erfolgte bei einer Wellenlänge von 380 nm. Die Emission wurde bei 440 nm detektiert. Wie im Falle des chromogenen Aktivitätstests dienten ECV als Positiv- und Puffer als Negativkontrolle. Die Durchführung des fluorogenen Tests erfolgte bei Raumtemperatur.

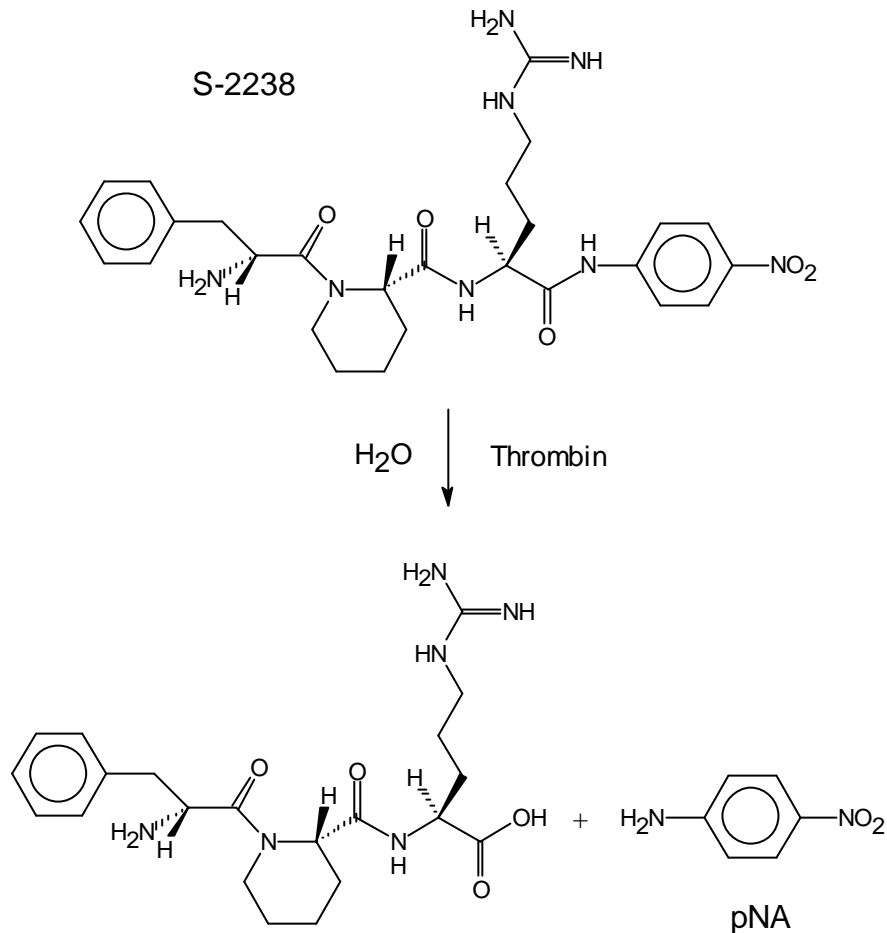


Abbildung 9: hydrolytische Spaltung des chromogenen Substrats S-2238 (H-D-Phe-Pip-Arg-pNA) durch Thrombin unter Freisetzung des gelben Farbstoffes para-Nitroanilin (pNA), der ein Absorptionsmaximum bei 405 nm aufweist.

2.3.10.2 zweistufiger Aktivitätstest

Im Rahmen dieser Tests wurden die Komponenten aus Kapitel 2.3.10.1 eingesetzt. In der ersten Stufe erfolgte die Aktivierung von Prothrombin durch das bakterielle Enzym für 10 Minuten. Hierbei wurde die Probe mit dem Prothrombin-Aktivator zunächst in 50 µl 20 mM MES-Puffer (pH 6) verdünnt, die Prothrombin in einer auf das Gesamtvolumen bezogenen Konzentration von 1 µM enthielten. Anschließend erfolgte die selektive Inaktivierung des bakteriellen Enzyms durch Zugabe von EDTA (siehe Kapitel 3.3.7) auf eine Endkonzentration von 1 mM.

In der zweiten Stufe wurden die Testbedingungen geändert, so dass die gebildeten Prothrombin-Aktivierungsprodukte unter standardisierten Bedingungen gemessen wurden. Es erfolgte die Zugabe von 50 µl des chromogenen bzw. fluorogenen Sub-

strates für Thrombin, gelöst in 50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, pH 8,3. Der Ablauf der Reaktion wurde mehrere Minuten lang photometrisch gemessen.

2.3.11 Bestimmung kinetischer Parameter

Für die Charakterisierung des bakteriellen Enzyms bezüglich der Aktivierung von Prothrombin wurde die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Substratkonzentration mit Hilfe des chromogenen Substrats für Thrombin ermittelt. Die Reaktionsansätze und die kinetischen Messungen wurden nach dem Prinzip des zweistufigen Aktivitätstests (Kap. 2.3.10.2) durchgeführt. Zur Aufnahme der Michaelis-Menten-Kinetik wurden ausgehend von einer Ausgangskonzentration des Substrats Prothrombin von 21,6 μM neun serielle 1:2 Verdünnungen erstellt und die Ansätze bei konstanter Enzymmenge in Dreifachbestimmung gemessen. Beachtet wurde die Faustregel, dass die Endkonzentration des chromogenen Substrats S-2238 (1 mM) mindestens um den Faktor 10 über dem Wert für die Michaelis-Menten-Konstante K_M des Substrats für humanes Thrombin von 7 μM (Herstellerangabe) lag, um das Problem eines vorzeitigen Substratverbrauchs auszuschalten.

Die Auswertung erfolgte mit dem Computerprogramm „GraFit“ (Version 4.03, 1998, Erithacus Software Limited), das durch nicht-lineare Regressionsrechnung die Messwerte an die Michaelis-Menten-Kurve anpasste und daraus die Parameter K_M und v_{\max} berechnete.

2.4 Gerinnungsanalytische Methoden

Die Messung der Gerinnungszeit erfolgte nach der mechanisierten Häkchenmethode mit einem Koagulometer nach Schnitger und Gross (Amelung, Lemgo). Eine als Häkchen geformte, unter Spannung stehende Elektrode wird durch das Reaktionsgemisch gezogen. Eine zweite, keinen Strom führende Elektrode bleibt im Reaktionsansatz. Erfolgt die Bildung eines Fibrinfadens im Rahmen der ablaufenden Gerinnung, so bleibt er am bewegten Häkchen hängen. Der Stromkreis wird geschlossen und eine Zeitschaltuhr abgeschaltet. Die Gerinnungszeit kann nun abgelesen werden.

Zur Durchführung wurden in einem vorgewärmten Glasröhrchen 100 μl humanes Normalplasma mit 100 μl 20 mM MES-Puffer (pH 6) zwei Minuten lang bei 37°C in-

kubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 µl Probe gestartet. Als Proben dienten Lösungen des bakteriellen Prothrombin-Aktivators beziehungsweise Inkubationsansätze von Prothrombin mit dem bakteriellen Enzym. Als Negativkontrolle wurde MES-Puffer eingesetzt. Die Schlangengifte *Russel's Viper Venom* (RVV) und *Echis Carinatus Venom* (ECV) mit einer Endkonzentration von je 1 µg/ml fungierten als Positivkontrolle.

3. Ergebnisse

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte eine Reihe bakterieller Organismen auf die Fähigkeit zur Bildung von Prothrombin-Aktivatoren hin untersucht werden. Anschließend sollte eine Isolierung und biochemische Charakterisierung dieser Aktivitäten erfolgen. Insbesondere sollte auch ihre Eignung für einen potentiellen Einsatz als diagnostische Werkzeuge in der Analytik getestet werden.

3.1 Isolierung eines bakteriellen Prothrombin-Aktivators

3.1.1 Suche nach Bakterien mit Prothrombin-Aktivatoren

11 Bakterienstämme, die nach Kriterien wie Humanpathogenität bzw. Verfügbarkeit ausgewählt worden waren, wurden auf die Fähigkeit zur Bildung von Prothrombin-Aktivatoren hin untersucht. Als Proben dienten sterilfiltrierte (0,45 µm) Medien von Übernachtskulturen, die durch Inokulieren von 5 ml CASO-Bouillon mit einer Einzelkolonie und Kultivierung bei 25°C erhalten wurden (Kap. 2.2.1). In einem einstufigen Aktivitätstest (Kapitel 2.3.10.1) lieferten die Bakterienarten *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus* und *Pseudomonas aeruginosa* deutliche Signale (Spaltung des chromogenen Thrombin-Substrates) (Tabelle 2).

Das stärkste Signal war bei dem gram-negativen Wasserkeim *Aeromonas hydrophila* zu beobachten. Dieser bildet Stäbchen aus und ist als Erreger von Fischinfektionen bekannt. Im Falle einer *Aeromonas hydrophila*-Infektion sterben Fische häufig an einer hämorrhagischen Sepsis (Austin & Austin, 1993; Del Corral et al., 1990; Panigagua et al., 1990). *Aeromonas hydrophila* ist fakultativ humanpathogen und verursacht beim Menschen Wundinfektionen und Durchfall (Altwegg & Geiss, 1989; Janda & Duffey, 1988; Holmberg et al., 1986). Beispiele für den pathogenen Charakter von *Aeromonas hydrophila* und für tödlich verlaufende Infektionen mit diesem Organismus finden sich bei immungeschwächten Patienten in Krankenhäusern (Hill et al., 1954; Scott et al., 1978; Picard et al., 1984).

Ein am Paul-Ehrlich-Institut isolierter *Aeromonas hydrophila*-Stamm wurde zur weiteren Charakterisierung der von ihm gebildeten Prothrombin-aktivierenden Aktivität ausgewählt.

<i>Aeromonas hydrophila</i>	+
<i>Bacillus cereus</i>	+
<i>E. coli</i>	-
<i>Klebsiella</i>	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+
<i>Pseudomonas putida</i>	-
<i>Serratia liquefaciens</i>	-
<i>Serratia marcescens</i>	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
<i>Streptococcus faecalis</i>	-

Tabelle 2: Ergebnis der Suche nach Prothrombin-Aktivatoren bei 11 Bakterienstämmen. Durch die Symbole + bzw. – wird das Vorhandensein bzw. Fehlen eines Signals im Aktivitätstest wiedergegeben. *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus* und *Pseudomonas aeruginosa* produzieren Prothrombin-Aktivatoren.

3.1.2 Untersuchung des bakteriellen Wachstumsverhaltens und der Freisetzung der enzymatischen Aktivität

Zur Untersuchung des Wachstumsverhaltens und der Freisetzung der Prothrombin-aktivierenden Aktivität wurde *Aeromonas hydrophila* im 50 ml-Maßstab in CASO-Bouillon bei 25°C und 200 rpm für 24 Stunden in einem Schüttelinkubator angezüchtet (Kap. 2.3.6). Der Kultur wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Proben zur Bestimmung der optischen Dichte (600 nm) und zur Messung der enzymatischen Aktivität des Prothrombin-Aktivators mittels eines zweistufigen Aktivitätstests (Kap. 2.3.10.2) entnommen (Abbildung 10).

Erst in der spätlogarithmischen Wachstumsphase der Kultur stieg die enzymatische Aktivität stark an und nahm auch nach dem Erreichen der stationären Phase weiter zu. Die gleichen Resultate ergaben sich auch bei der Untersuchung der *Aeromonas hydrophila* Referenzstämme Nr. 6173, 6394 und 30014 von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Braunschweig).

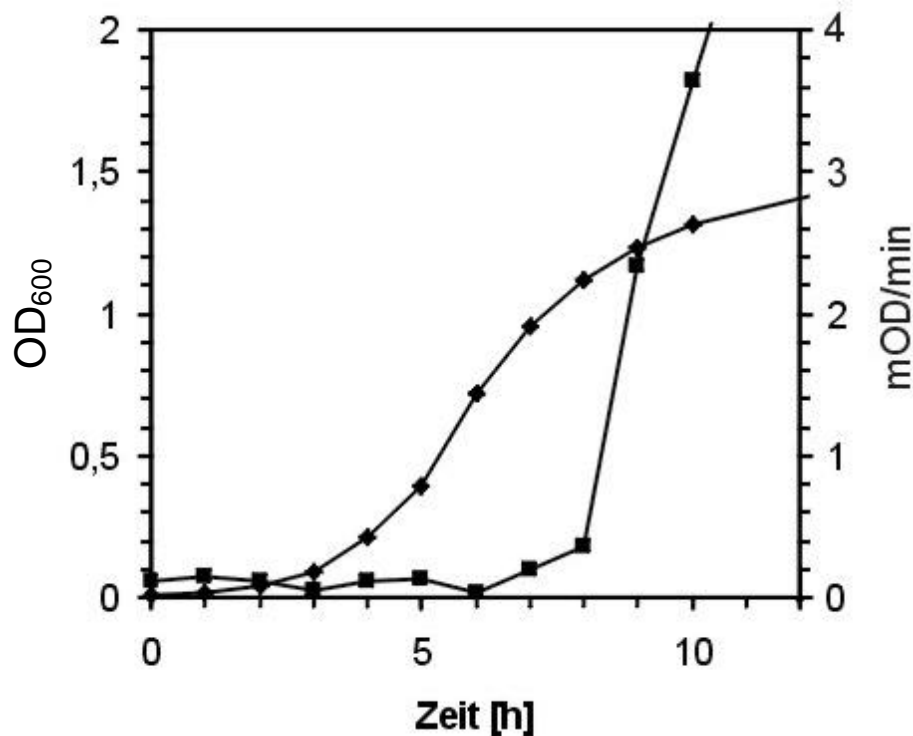


Abbildung 10: Zeitlicher Verlauf der optischen Dichte bei 600 nm (◆) und der freigesetzten enzymatischen Aktivität (■) einer *Aeromonas hydrophila*-Kultur. Die Aktivitätsmessung erfolgte durch einen zweistufigen, chromogenen Test (Kap. 2.3.10).

Im Hinblick auf die nachfolgende Reinigung des Enzyms wurden analoge Untersuchungen auch für eine 8 Liter-Kultur über einen Zeitraum von sechs Tagen unter ansonsten gleichen Kultivierungsbedingungen durchgeführt. Der prinzipielle Verlauf der OD₆₀₀ und der Prothrombin aktivierenden Aktivität stimmten mit den oben beschriebenen Ergebnissen überein. Es dauerte allerdings länger (annähernd vier Tage) bis die stationäre Phase erreicht war. Maximale Aktivität wurde nach fünf Tagen festgestellt. Deshalb wurde dieser Zeitraum für die Anzucht einer *Aeromonas hydrophila*-Kultur zur Isolierung des Prothrombin-Aktivators gewählt.

3.1.3 Reinigung des Prothrombin-Aktivators

Ausgangspunkt für die Isolierung der Prothrombin-aktivierenden Aktivität waren 8 Liter einer *Aeromonas hydrophila*-Kultur, die für fünf Tage bei 225 rpm und 25°C in einem Schüttelinkubator kultiviert worden war (Kapitel 2.3.7). Nach Abtrennung der Zellen und Zelltrümmer durch Zentrifugation wurde das Kulturmedium durch Ultrafiltration (Ausschlußgrenze 10 kDa) auf ein Volumen von 300 ml eingeeengt. Zur weiteren Reduzierung des Probenvolumens und zur Abtrennung niedermolekularer Peptide der CASO-Bouillon wurde Ammoniumsulfat zugesetzt (66% Sättigung). Nach Inkubation über Nacht bei 4°C wurden die gefällten Proteine durch Zentrifugation gesammelt und anschließend in 20 ml des Chromatographiepuffers A (10 mM HEPES, pH 7,5) aufgenommen. Nach der Ammoniumsulfatfällung waren noch jeweils ungefähr 71% der Proteinmenge beziehungsweise der Prothrombin-aktivierenden Aktivität bezogen auf die ursprünglichen acht Liter Kulturmedium vorhanden (Tabelle 3). Reste des Ammoniumsulfats wurden durch Dialyse gegen Puffer A entfernt und die Probe nach dem Sterilfiltrieren (0,45 µm) für den ersten chromatographischen Reinigungsschritt, eine Anionentauscherchromatographie, eingesetzt.

3.1.3.1 Anionentauscherchromatographie mit Q Sepharose FF

Als erster Chromatographieschritt wurde eine Anionentauscherchromatographie an Q Sepharose FF durchgeführt (Kap. 2.3.8.2). Die nach der Ammoniumsulfatfällung erhaltene, dialysierte Probe wurde bei pH 7,5 aufgetragen und die Säulenmatrix anschließend mit Puffer A gewaschen. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte mit einem linearen 0 – 300 mM NaCl-Gradienten in Puffer A und wurde durch Messung der Absorption bei 280 nm charakterisiert. Der Prothrombin-Aktivator wurde mit Hilfe des einstufigen Aktivitätstests (Kap. 2.3.10.1) lokalisiert. Das Elutions- und das Aktivitätsprofil sind in Abbildung 11 wiedergegeben und zeigen, dass ein großer Teil der Proteine nicht an die Säulenmatrix gebunden hatte und dadurch abgetrennt wurde. Der Prothrombin-Aktivator wurde bei einer Kochsalzkonzentration von 110 mM eluiert. Fraktionen mit der höchsten Aktivität (grau unterlegter Bereich in Abbildung 11) wurden vereinigt. In den vereinigten Fraktionen („Pool 1“) zeigten sich noch 63% der ursprünglich vorhandenen enzymatischen Aktivität und 1,9% der Ausgangsproteinmenge (Tabelle 3).

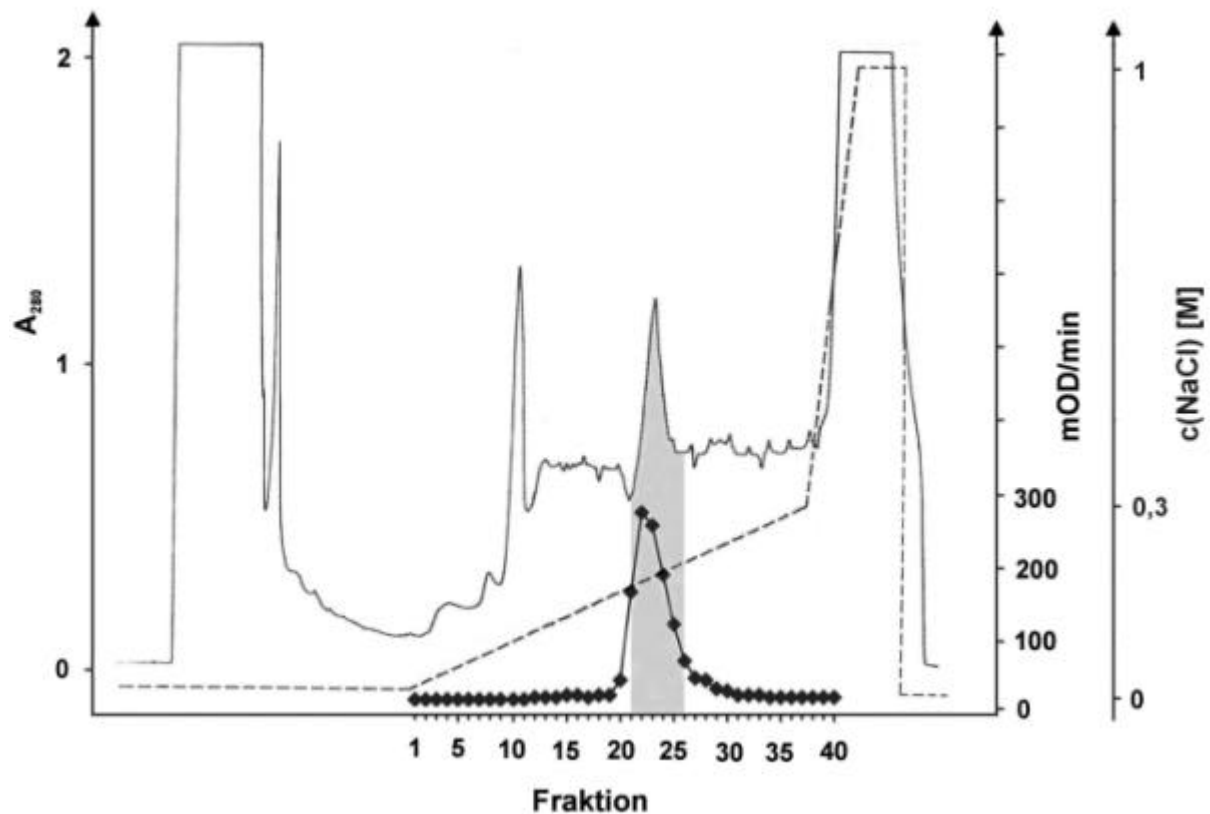


Abbildung 11: Anionentauscherchromatographie des Dialysats nach der Ammoniumsulfatfällung an Q Sepharose FF.

(—) A_{280} , (◆) Aktivität, (- - -) NaCl-Gradient, (■) „Pool 1“

3.1.3.2 Affinitätschromatographie mit Benzamidin-Sepharose

Für die weitere Anreicherung des Prothrombin-Aktivators wurde eine gruppenspezifische Affinitätschromatographie an *p*-Aminobenzamidin-Sepharose (Kap. 2.3.8.3) durchgeführt. Als Ausgangsmaterial diente der nach der Anionentauscherchromatographie erhaltene „Pool 1“. Die Proteinlösung wurde durch Dialyse gegen Puffer A auf die Chromatographiebedingungen eingestellt, sterilfiltriert (0,45 μ M) und auf die Säule aufgetragen. Ungebundene Proteine wurden durch Waschen mit Auftragspuffer entfernt. Die Elution erfolgte mit einem linearen Gradienten von 0 – 300 M NaCl in Puffer A und wurde sowohl durch Messung der Absorption bei 280 nm als auch durch chromogene Aktivitätstests verfolgt. Das Elutionsprofil und die Verteilung der Prothrombin aktivierenden Aktivität in den Fraktionen sind in Abbildung 12 gezeigt. Die Fraktionen höchster Aktivität (grau unterlegter Bereich) wurden vereinigt („Pool 2“) und für den nächsten Reinigungsschritt gegen Puffer A dialysiert und sterilfiltriert. Nach dem Benzamidin-Sepharose-Chromatographieschritt verblieb in „Pool 2“ noch

eine Restaktivität von ca. 38% und eine Proteinmenge von 0,2% des Ursprungswerts.

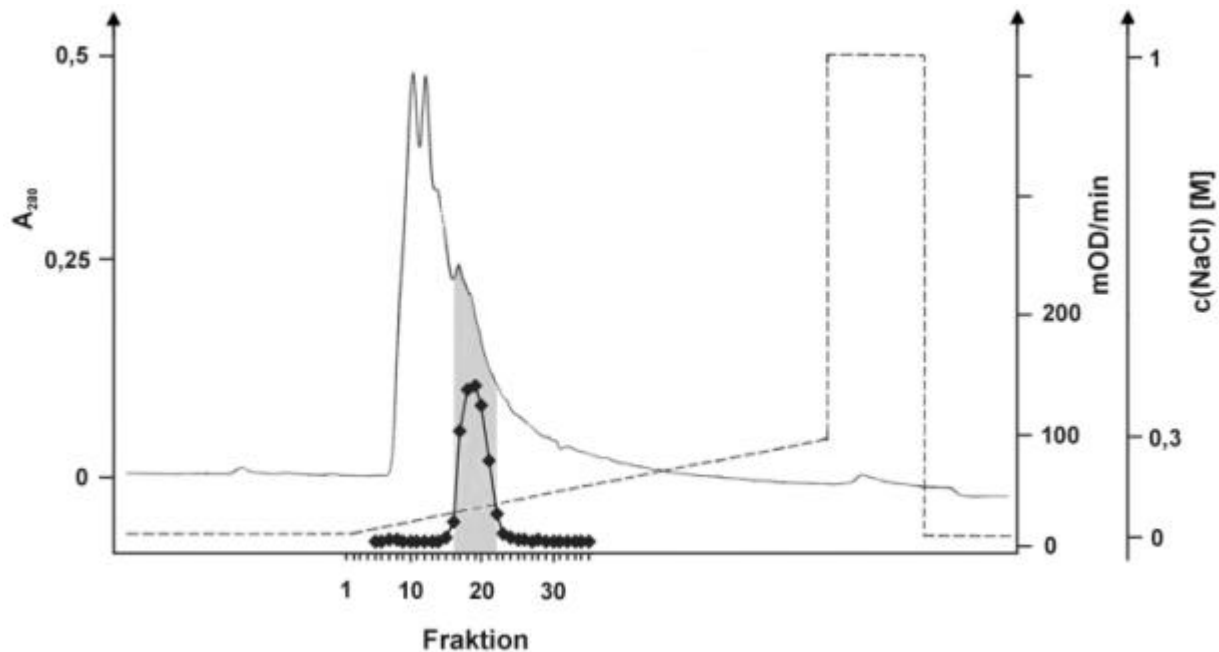


Abbildung 12: Affinitätschromatographie der vereinigten Fraktionen nach dem Anionentauscherschritt an *p*-Aminobenzamidin-Sepharose.

(—) A_{280} , (◆) Aktivität, (- - -) NaCl-Gradient, (■) „Pool 2“

3.1.3.3 Konzentrieren der Proteinlösung mittels Anionentauscher Poros QE 20

Um die nach dem Benzamidin-Sepharose-Chromatographieschritt erhaltene Proteinlösung für die anschließende Gelpermeationschromatographie zu konzentrieren, wurden die Proteine bei pH 7,5 auf eine Poros QE 20-Anionentauschersäule aufgetragen (Kap. 2.3.8.4). Nach Waschen mit dem Auftragspuffer und Umkehr der Fließrichtung, erfolgte die Elution der gebundenen Proteine bei einer niedrigen Fließgeschwindigkeit (0,2 ml/min) mit 1 M NaCl in Puffer A. Die proteinhaltigen Elutionsfraktionen wurden vereinigt und sterilfiltriert (0,45 μ m).

3.1.3.4 Gelpermeationschromatographie

Als letzter Reinigungsschritt wurde eine Gelpermeationschromatographie mit Sephacryl S200 durchgeführt (Kap. 2.3.8.5). SDS-PAGE-Analysen (Abbildung 15) zeigten, dass „Pool 2“ neben niedermolekularen Proteinen auch noch solche mit Molekulargewichten von 35 bzw. 60 kDa enthielt. Eine Fraktionierung dieser Komponenten sollte durch das gewählte Säulenmaterial S200 erreicht werden, welches für die

Trennung von globulären Proteinen mit Molekulargewichten zwischen 5 und 250 kDa geeignet ist. Die Trennleistung der Säule wurde mit einem Gelfiltrationsstandard überprüft und zeigte eine Auflösung der eingesetzten Standardproteine im Elutionsprofil, die durch Pfeile und Angabe der zugehörigen Molmassen in Abbildung 13 dargestellt sind.

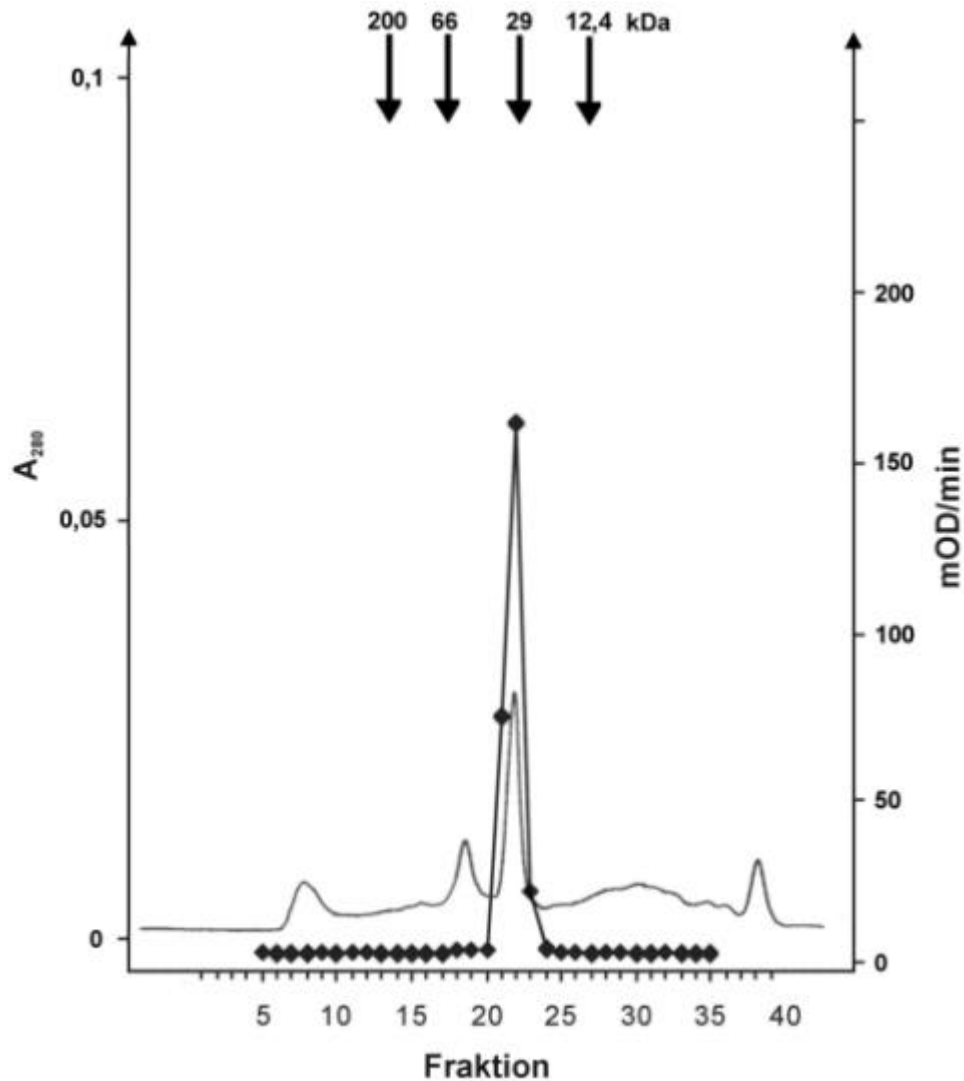


Abbildung 13: Gelpermeationschromatographie der vereinigten Fraktionen nach Konzentrierung mittels Anionentauscher Poros QE 20 an Sephacryl S200.

(—) A_{280} , (◆) Aktivität

Als Ausgangsmaterial dienten die vereinigten Elutionsfraktionen des Anionentauschers Poros QE 20 mit einem Gesamtvolumen von 1 ml. Nach dem Probenauftrag wurde die Elution mit Puffer B (10 mM HEPES, pH 7,5, 300 mM NaCl) durchgeführt und das Elutionsprofil der chromatographierten Proteine photometrisch ermittelt (Abbildung 13). Das Enzym wurde mit Hilfe des einstufigen Aktivitätstests (Kap. 2.3.10.1)

detektiert. Die Fraktionen maximaler enzymatischer Aktivität wurden vereinigt („Pool 3“). Bezogen auf die ursprünglich vorhandene Aktivität zeigte sich nach der Gelpermeationschromatographie noch eine Restaktivität von 15% und ein Proteinmenge von 0,02% des Ausgangswerts (Tab. 3).

Es ergab sich eine gute Übereinstimmung des Maximums im Aktivitätsprofil mit einem Proteinpeak im Elutionsprofil, der in einem Molekulargewichtsbereich von ungefähr 30 kDa liegt.

Untersuchungen von „Pool 3“ nach der Gelpermeationschromatographie durch diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter reduzierenden bzw. nicht-reduzierenden Bedingungen zeigten jeweils eine diskrete Bande bei einem Molekulargewicht von 35 kDa (Abb. 14). Daraus lässt sich schließen, dass der Prothrombin-Aktivator aus einer einzelnen Polypeptidkette besteht und offensichtlich frei von Kontaminationen war.

Die gute Übereinstimmung zwischen dem aus der SDS-PAGE ermittelten Molekulargewicht und dem mittels der Gelpermeationschromatographie bestimmten, deutet auf eine globuläre Struktur des Prothrombin-Aktivators hin.

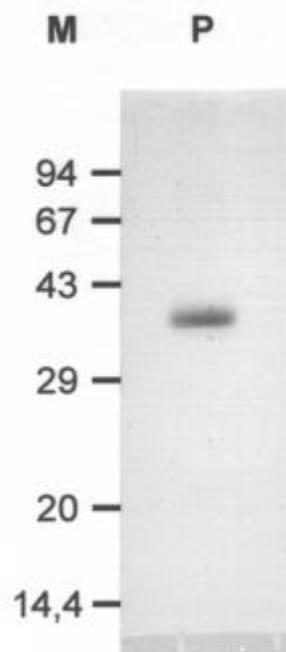


Abbildung 14: 12,5%iges SDS-Polyacrylamidgel (reduzierende Bedingungen) zur Analyse des Prothrombin-Aktivators (P) nach der Gelpermeationschromatographie. Für die Untersuchung wurden 2 µg des Enzyms eingesetzt. Die Proteinbanden wurden durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. (M) Molmassenstandard

3.1.3.5 Übersicht des Reinigungsschemas des Prothrombin-Aktivators aus einer *Aeromonas hydrophila*-Kultur

Die Reinigung des Prothrombin-Aktivators wurde mit einer SDS-PAGE-Analyse (Abbildung 15) verfolgt und in einer Reinigungstabelle (Tab. 3) zusammengefasst. Als Ausgangsmaterial dienten 8 Liter Medium einer *Aeromonas hydrophila*-Kultur. Zur Reduzierung des Probevolumens und zur Abtrennung niedermolekularer Peptide der CASO-Bouillon erfolgte zunächst eine Ultrafiltration und danach eine Ammoniumsulfatfällung. Die nach Resuspendieren in Chromatographiepuffer und Abtrennung der Ammoniumsulfatreste durch Dialyse erhaltene Proteinlösung wurde für ein dreistufiges chromatographisches Reinigungsverfahren eingesetzt.

Die Ammoniumsulfatfällung lieferte keine Erhöhung der spezifischen Aktivität. Ein Verlust an enzymatischer Aktivität von knapp 30 % ging mit einer Verringerung der Proteinmenge in derselben Größenordnung einher.

Im ersten chromatographischen Reinigungsschritt, der Anionentauscherchromatographie an einer Q Sepharose FF-Matrix und Elution der gebundenen Proteine mit einem linearen NaCl-Gradienten, wurde ein großer Teil der Proteine abgetrennt. Die spezifische Aktivität nahm um den Faktor 34 zu und der Prothrombin-Aktivator wurde stark konzentriert.

Der anschließende Schritt der gruppenspezifischen Affinitätschromatographie an *p*-Aminobenzamidin-Sepharose führte zu einer 181-fachen Steigerung der spezifischen Aktivität mit einer Ausbeute von 37,8 % bezogen auf die Aktivität im Kulturüberstand. Das SDS-Gel (Abb. 15) zeigte die gelungene Abtrennung von Proteinen mit Molekulargewichten von 40 und 28 kDa. Bei einer Chromatographie mit *p*-Aminobenzamidin-Sepharose beruht die Trennung von Proteinen auf Ionentauscher-Effekten der positiv geladenen Matrix und/oder auf Affinitätseffekten (Trypsin-ähnliche Serinproteasen binden an das immobilisierte Benzamidin).

Als dritter chromatographischer Reinigungsschritt wurde eine S200-Gelfiltration durchgeführt. Durch diese Methode wurde der Prothrombin-Aktivator mit einer Ausbeute von 15,6 % und einem Reinigungsfaktor von 747 erhalten. Im Elutionsprofil (Abb. 13) und im SDS-Gel (Abb. 15) war deutlich die gelungene Abtrennung des Prothrombin-Aktivators von einem Protein mit einer Molmasse von ungefähr 60 kDa und anderen Verunreinigungen im unteren Molekulargewichtsbereich zu erkennen.

Reinigungs- schritt	Proteinmenge [mg]	Gesamtaktivität [mOD×ml/min]	Spez. Aktivität [mOD×ml/(min×mg)]	Ausbeute [%]	Reinigungs- faktor
Kulturmedium	960	37440	39	100	1
AS-Fällung	684	26600	39	71	1
Q Sepharose FF	18	23600	1311	63	34
Benzamidin-S.	2	14100	7050	37,8	181
S200	0,2	5830	29150	15,6	747

Tabelle 3: Reinigungstabelle des Prothrombin-Aktivators. Die Proteinbestimmung erfolgte mit dem BCA-Test (Kap. 2.3.5.2), die Bestimmung der enzymatischen Aktivität wurde mit dem zweistufigen Aktivitätstest (Kap. 2.3.10.2) durchgeführt.

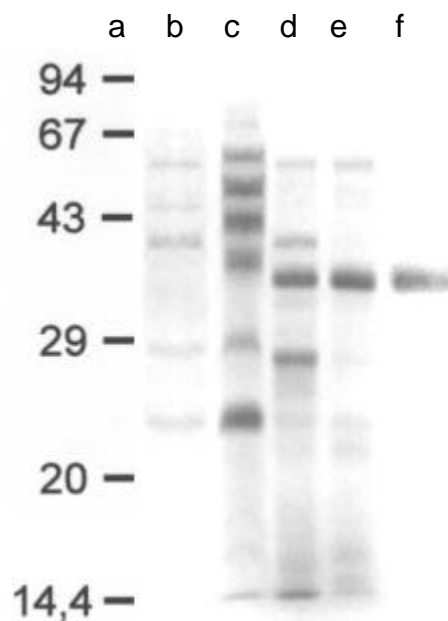


Abbildung 15: 12,5 %iges SDS-Polyacrylamidgel (reduzierende Bedingungen) zur Analyse der Reinigung des Prothrombin-Aktivators aus einer *Aeromonas hydrophila*-Kultur.

Es wurden je 23 µg Protein untersucht. Die Proteinbanden wurden durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht.

Spur a: Molmassenstandard

Spur b: Kulturmedium

Spur c: Konzentrat nach Ammoniumsulfat-Fällung

Spur d: „Pool 1“ nach Q Sepharose FF-Anionentauscher-Chromatographie

Spur e: „Pool 2“ nach Benzamidin-Sepharose-Chromatographie

Spur f: „Pool 3“ nach S-200 Gelpermeationschromatographie

3.2 Analyse der Spaltung von Prothrombin und anderer Proteine

3.2.1 Untersuchung der Prothrombin-Spaltprodukte

3.2.1.1 Charakterisierung durch ein Inhibitor-Profil und gerinnungsanalytische Methoden

Die durch die bakterielle Protease generierten Prothrombin-Spaltprodukte sind in der Lage, synthetische chromogene und fluorogene, Thrombin-spezifische Peptid-Substrate (S-2238, Pefachrome Th, Boc-Val-Pro-Arg-AMC, Boc-Asp(Obzl)-Pro-Arg-AMC) umzusetzen. Dahingegen erfolgt keine Spaltung der Faktor Xa-spezifischen Substrate (S-2222, S-2765, Pefachrome Xa, Boc-Ile-Glu-Gly-Arg-AMC).

Bei der Prothrombin-Aktivierung durch Faktor Xa entstehen als aktive Serinproteasen Meizothrombin (Zwischenprodukt) und α -Thrombin (siehe Kap. 1.2). Diese sind durch allgemeine Serin-Protease-Inhibitoren wie beispielsweise Pefabloc SC, PMSF und Benzamidin hemmbar. Darüber hinaus werden sie durch spezifische Hemmstoffe wie beispielsweise PPACK, Antithrombin III / Heparin oder Hirudin inaktiviert.

Im Falle der Aktivierung von Faktor II durch die bakterielle Protease war ebenfalls mit der Entstehung einer amidolytisch aktiven Form des Thrombins zu rechnen. Zur näheren Charakterisierung der gebildeten Aktivitäten wurde daher in chromogenen, zweistufigen Aktivitätstests (Kap. 2.3.10.2) ein Inhibitorprofil erstellt.

Hierbei wurden zunächst je 10 ng (≈ 6 nM) des bakteriellen Enzyms mit 1 μ M Prothrombin in 50 μ l 20 mM MES-Puffer (pH 6) für 5 Minuten inkubiert und anschließend der Aktivierungsvorgang durch EDTA-Zusatz (1 mM) gestoppt (Kapitel 3.3.3 und 3.3.7). Danach wurden die erzeugten Prothrombin-Spaltprodukte für 30 min bei 37°C mit den in Tabelle 4 angegebenen Endkonzentrationen verschiedener Inhibitoren inkubiert. Die verbliebenen Restaktivitäten im Bezug auf einen Ansatz ohne Inhibitorzugabe, wurden durch Zugabe von 50 μ l des Substrats S2238 und Messung des Verlaufs der Absorption bei 405 nm über mehrere Minuten bestimmt. Die erhaltenen Werte sind in Tabelle 4 aufgelistet.

Allgemeine Serin-Protease-Inhibitoren (Pefabloc SC, PMSF, Benzamidin) bewirkten eine moderate Hemmung (25-35% Restaktivität). Dahingegen führten PPACK, Hirudin und ATIII / Heparin zu einer fast vollständigen Inhibition der Prothrombin-Aktivierungsprodukte (Restaktivitäten von 5, 3 bzw. 14% jeweils). Aufgrund bekannter

ter Literaturdaten sind daher Thrombin oder Meizothrombin mögliche Produkte der Prothrombin-Spaltung durch das bakterielle Enzym, besonders wegen der hocheffizienten Hemmung durch Hirudin.

Inhibitor	Konzentration	Restaktivität
ohne		100%
Pefabloc SC	2 mM	25%
PMSF	4 mM	34%
Benzamidin	5 mM	25%
PPACK	2 μ M	5%
Hirudin	140 nM	3%
ATIII/Heparin	0.5 / 10 U pro ml	14%
Heparin	10 U/ml	100%
ATIII	0.5 U/ml	37%

Tabelle 4: Inhibitorprofil der durch die bakterielle Protease gebildeten aktiven Prothrombin-Spaltprodukte. Dargestellt sind die eingesetzten Inhibitoren, deren Endkonzentration und die gemessenen Restaktivitäten bezogen auf die Aktivität ohne Hemmstoff.

In anderen Experimenten wurden die erzeugten Prothrombin-Spaltprodukte nach Hemmung des bakteriellen Enzyms durch EDTA (Kap. 3.3.7) mit gereinigtem Fibrinogen inkubiert. Dies lag zur Vermeidung der Gerinnselbildung stark verdünnt vor. Bei diesen Untersuchungen wurde entweder eine Verdünnungsreihe der Prothrombin-Aktivierungsprodukte eingesetzt und mehrere Ansätze untersucht oder einem Reaktionsansatz wurden zu unterschiedlichen Zeiten Proben entnommen.

Durch Auftrennen der Proben auf einem SDS-Gel zeigte sich, dass die gebildeten Prothrombin-Spaltprodukte sowohl zeit- als auch konzentrationsabhängig die Prozessierung von humanem Fibrinogen unter Bildung von Fibrin bewirkten. Auch in dieser Hinsicht ähneln die gebildeten Aktivitäten authentischem Thrombin, das nach der Prothrombin-Spaltung durch den aktivierten Faktor X entsteht.

Eine weitere interessante Frage war, ob die Reaktionsprodukte der Prothrombin-Aktivierung fähig sind, die Gerinnung von Plasma zu induzieren. Deshalb wurde eine Messungen der Gerinnungszeiten (Kap. 2.4) mit Citrat-haltigem, humanen Normalplasma sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit der Produkte einer Prothrombin-Aktivierung durch das bakterielle Enzym durchgeführt.

Zu diesem Zweck wurde 1 ml einer 1 μ M Prothrombin-Lösung mit dem bakteriellen Enzym (10 nM) 60 Minuten lang bei 25°C vorinkubiert. Anschließend wurde die Prothrombin-Aktivierung durch EDTA gestoppt. Als Kontrolle wurde ein analoger Ansatz ohne die *Aeromonas hydrophila*-Protease unter gleichen Bedingungen inkubiert.

In einem Koagulometer nach Schnitger und Gross wurden 100 μ l Normalplasma mit 100 μ l 20 mM MES-Puffer (pH 6) versetzt und auf 37°C vortemperiert. Die Zeitmessung wurde nach Zugabe von 100 μ l der obigen Reaktionsansätze bzw. 100 μ l MES-Puffer (als weitere Kontrolle) gestartet. Es wurden jeweils Dreifachmessungen durchgeführt. Während in Abwesenheit der Prothrombin-Aktivierungsprodukte keine Gerinnung innerhalb von 600 Sekunden messbar war, ergab sich bei dem Ansatz mit Prothrombin-Spaltprodukten eine Gerinnungszeit von 86 Sekunden. Ähnlich wie authentisches Thrombin induzieren die Produkte einer Prothrombin-Spaltung durch die bakterielle Protease also die Gerinnung in humanem Normalplasma.

Die oben beschriebenen Vorarbeiten zeigten deutliche Ähnlichkeiten zwischen den durch das bakterielle Enzym gebildeten aktiven Prothrombin-Spaltprodukten und α -Thrombin bzw. Meizothrombin, die bei der Aktivierung von Prothrombin durch Faktor Xa bzw. Ecarin entstehen.

3.2.1.2 Untersuchung der aktiven Prothrombin-Spaltprodukte

Nachweis im Western-Blot

Um das bei der Prothrombin-Spaltung durch die bakterielle Protease entstehende Muster an Spaltprodukten zu untersuchen, wurde 1 ml einer 5 μ M Prothrombin-Lösung mit dem Enzym (10 nM) bei 25°C inkubiert. Im Rahmen zweier Ansätze wurde die Reaktion entsprechend der bestimmten Aktivitätsmaxima (Kap. 3.3.4) einmal in Abwesenheit und zum anderen in Gegenwart von 1,5 M NaCl durchgeführt. Den Reaktionsansätzen wurden zu verschiedenen Zeiten Proben entnommen und der Prothrombin-Aktivierungsprozess darin durch Zugabe von EDTA (1 mM) gestoppt. Anschließend wurden die Proben gelelektrophoretisch aufgetrennt und in einem Western-Blot mit polyklonalen Antikörpern gegen Prothrombin analysiert (Kap. 2.3.2). Sowohl in Gegenwart, als auch in Abwesenheit von NaCl zeigte sich ein vollständiger Abbau der Prothrombin-Bande im Verlauf der Reaktion mit der bakteriellen Protease unter Ausbildung eines komplexen Bandenmusters.

Die in Kapitel 3.2.1.1 beschriebenen Experimente zeigten deutlich ausgeprägte Ähnlichkeiten zwischen den durch das bakterielle Enzym gebildeten aktiven Prothrombin-Spaltprodukten und α -Thrombin bzw. Meizothrombin, die bei der Aktivierung von Prothrombin durch Faktor Xa entstehen. Falls es zur Bildung von Meizothrombin bzw. α -Thrombin im Rahmen der Prothrombin-Spaltung durch das bakterielle Enzym kommt, wäre das Auftreten der entsprechenden Banden bei einem apparenten Molekulargewicht von 72 bzw. 40 kDa zu erwarten gewesen. In diesen Bereichen zeigten sich mehrere Banden und eine eindeutige Zuordnung war nicht möglich. Die Tatsache, dass Banden höherer Intensität in anderen Molekulargewichtsbereichen zu beobachten waren, deutet darauf hin, dass Meizothrombin bzw. α -Thrombin nicht die Hauptprodukte der Prothrombin-Spaltung durch das bakterielle Enzym sind. Die Vermutung liegt nahe, dass es bei der Prothrombin-Umsetzung mehrere alternative Abbauwegen gibt. Einige davon führen zur Bildung von (Zwischen-)Produkten mit Thrombin-ähnlichen Eigenschaften.

Um in dem komplexen Muster solche Banden zu identifizieren, die katalytisch aktiven Spaltprodukten entsprechen, wurden diese affinitätsmarkiert. Hierbei wurde der Umstand ausgenutzt, dass die erzeugten Thrombin-ähnlichen Aktivitäten durch ein Konjugat aus PPACK (D-Phe-Pro-Arg-Chloromethylketon) und Biotin hemmbar waren. Bei PPACK handelt es sich um einen Thrombin-Inhibitor, der eine kovalente Bindung mit dem Histidin-Rest des aktiven Zentrums ausbildet. Der Biotin-Rest ermöglicht die Bindung eines Avidin-Peroxidase-Konjugats und somit den Nachweis der biotinylierten Proteine in einem Western-Blot.

Ausgangspunkt war ein Inkubationsansatz von Prothrombin mit dem bakteriellen Enzym, in dem die Aktivierungsreaktion nach einer Stunde durch EDTA-Zugabe (Kap. 3.3.7) abgebrochen wurde. Eine Affinitätsmarkierung der gebildeten, aktiven Prothrombin-Spaltprodukte wurde danach durch 30 minütige Vorinkubation mit einem PPACK-Biotin-Konjugat (Endkonzentration 2 μ M) durchgeführt. Der Nachweis der biotinylierten Proteine erfolgte durch eine Western-Blot-Analyse (Kap. 2.3.2). Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der Proteine und dem Transfer auf eine PVDF-Membran, wurde diese mit einem ExtrAvidin-Peroxidase-Konjugat inkubiert. Das an die Biotinreste gebundene ExtrAvidin-Peroxidase-Konjugat kann dann über die von der Peroxidase katalysierte Färbereaktion mit 3,3'-Diaminobenzidin und Wasserstoffperoxid (30%) nachgewiesen werden. An den Positionen der aktiven

Prothrombin-Fragmente bildete sich ein braunes Präzipitat aus. Ein Beispiel für solch einen Western-Blot ist in Abbildung 16 gezeigt.

Im Falle des Inkubationsansatzes von Prothrombin mit der bakteriellen Protease zeigten sich zwei Banden, die aktiven Spaltprodukten entsprachen (Spur 1). Ein Reaktionsprodukt bei einem apparenten Molekulargewicht von 35 kDa lief auf gleicher Höhe wie authentisches humanes α -Thrombin (Spur 2), das durch Faktor Xa generiert und für dieses Experiment ebenfalls vor der SDS-PAGE mit dem biotinylierten PPACK markiert worden war. Dahingegen hatte die zweite Bande bei 25 kDa kein Gegenstück in der Referenzspur 2. Dort zeigte sich eine Bande geringer Intensität bei 72 kDa. Hierbei handelt es sich um Meizothrombin, das als Zwischenprodukt der Prothrombin-Aktivierung durch Faktor Xa auftritt.

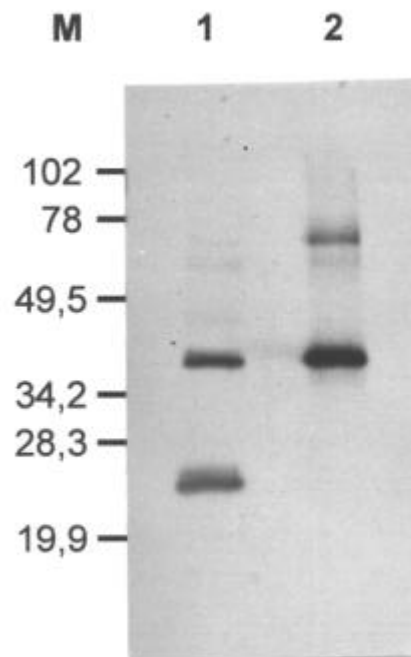


Abbildung 16: Affinitätsmarkierung der Reaktionsprodukte der Prothrombin-Aktivierung durch die bakterielle Protease. Die Prothrombin-Aktivierungsprodukte wurden 30 min lang mit 2 μ M biotinylierten PPACK inkubiert und dann über SDS-PAGE aufgetrennt, gefolgt von einem Elektrotransfer auf eine PVDF-Membran. Nach Inkubation mit einem ExtrAvidin-Peroxidase-Konjugat erfolgte die Detektion der aktiven Spaltprodukte über eine Färbereaktion mit H_2O_2 und 3,3'-Diaminobenzidin. Auf die gleiche Weise wurde kommerziell erworbenes Thrombin markiert und elektrophoretisch aufgetrennt.

Spur M: Molmassenstandard

Spur 1: Prothrombin-Aktivierungsprodukte

Spur 2: Thrombin

Die oben beschriebenen, zu unterschiedlichen Zeiten entnommenen Proben der beiden Inkubationsansätze des bakteriellen Enzyms mit Prothrombin in Gegenwart von 0 bzw. 1,5 M NaCl wurden ebenfalls mit biotinyliertem PPACK 30 min lang vorinkubiert. Anschließend erfolgte der Nachweis aktiver Spaltprodukte über Western-Blots nach dem oben dargestellten Prinzip. Das erhaltene Bandenmuster stimmte bei den beiden Ansätzen überein. Abbildung 17 zeigt exemplarisch den Western-Blot mit Proben des Reaktionsansatzes ohne NaCl.

Bei der Prothrombin-Spaltung durch die bakterielle Protease entstand zunächst das „aktive“ Produkt bei 35 kDa. Erst später wurde das ebenfalls „aktive“ 25 kDa-Protein gebildet.

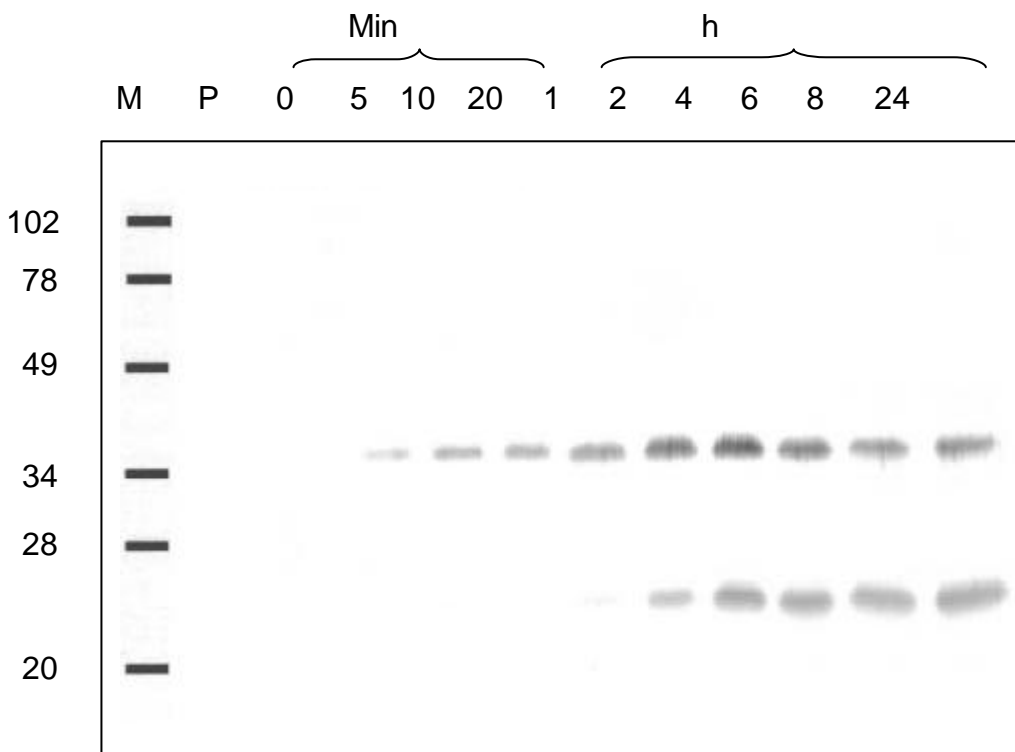


Abbildung 17: Zeitlicher Verlauf der Entstehung aktiver Prothrombin-Spaltprodukte. Die zu verschiedenen Zeiten entnommenen Proben eines Reaktionsansatzes von Prothrombin mit dem bakteriellen Enzym in Gegenwart von 0 M NaCl wurden mit biotinyliertem PPACK inkubiert. Anschließend erfolgte der Nachweis der aktiven, markierten Spaltprodukte in einem Western-Blot mit ExtrAvidin-Peroxidase-Konjugat und Färbereaktion. Das erhaltene Bandenmuster entsprach dem des analogen Blots mit den Proben des Reaktionsansatzes bei hoher Salzkonzentration. Neben dem Molmassenstandard (M) und kommerziell erworbenem Prothrombin (P), sind die Proben unterschiedlicher Reaktionszeit aufgetragen.

Aminoterminaler Sequenzierung nach Edman

Zur Ermittlung der aminoterminalen Sequenzen der beiden „aktiven“ Prothrombin-Prozessierungsprodukte erfolgte die Inkubation von 500 µl einer 5 µM Faktor II – Lösung mit dem bakteriellen Enzym (Endkonzentration 10 nM) für 1 Stunde bei 25°C. Nach EDTA-Zugabe wurde, in Anlehnung an die von Matsudaira (1989) beschriebene Methode, eine SDS-PAGE durchgeführt und die aufgetrennten Proteine durch Elektrophoretentransfer auf eine PVDF-Membran überführt (Kap. 2.3.3). Die auf der Transfermembran immobilisierten Proteine wurden durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht und die Banden der beiden „aktiven“ Prothrombin-Fragmente (Molekulargewicht 25 bzw. 35 kDa) für die Sequenzierung durch automatisierten Edman-Abbau (Kap. 2.3.4) ausgeschnitten.

Die Bestimmung der ersten 10 N-terminalen Aminosäurereste ergab für beide Fragmente jeweils eine Übereinstimmung mit dem Aminoterminus der B-Kette von humanem α -Thrombin (IVEGSDAEIG). Bei der 35 kDa-Bande handelt es sich offenbar um authentisches α -Thrombin. Das bakterielle Enzym spaltet, ebenso wie der physiologische Prothrombin-Aktivator Faktor Xa, zwischen Arg₃₂₀-Ile₃₂₁ im humanen Prothrombin-Molekül, der Grenze zwischen A- und B-Kette des Thrombins. Dagegen stellt das ebenfalls „aktive“ Prothrombin-Fragment mit einem Molekulargewicht von 25 kDa vermutlich ein Zerfallsprodukt von α -Thrombin dar. Die Spaltung erfolgt wahrscheinlich C-terminal vom Histidin-Rests des aktiven Zentrums. Diese Vermutung wird durch die Größe des Fragments unterstützt.

Untersuchung der Spaltung von α -Thrombin durch die bakterielle Protease

Um zu klären, ob α -Thrombin unter den Versuchsbedingungen autokatalytisch zerfällt oder durch die bakterielle Protease zum 25 kDa-Fragment prozessiert wird, wurde das nachfolgende Experiment durchgeführt: 500 µl einer 5 µM Lösung humanen α -Thrombins in 20 mM MES-Puffer (pH 6) wurden mit dem Enzym aus *Aeromonas hydrophila* (Endkonzentration 10 nM) versetzt und der Ansatz in drei gleichgroße Aliquots aufgeteilt. Der erste Ansatz wurde sofort mit EDTA (1 mM) versetzt und bei –80 °C gelagert. Der zweite und der dritte Ansatz wurden 24 Stunden lang bei 25°C inkubiert, wobei dem zweiten Ansatz zur Inaktivierung des bakteriellen Enzyms von Anfang an EDTA in einer Endkonzentration von 1 mM zugesetzt worden war.

Im Anschluss an eine Affinitätsmarkierung der Ansätze in Gegenwart von 2 μ M des PPACK-Biotin-Konjugats, wurde eine SDS-PAGE und ein Elektrotransfer durchgeführt. Nach Inkubation mit ExtrAvidin-Peroxidase-Konjugat und Färbereaktion zeigte der erhaltene Western-Blot (Abbildung 18) im Falle der Ansätze Nummer eins und zwei, bei denen die bakterielle Protease von Beginn an ausgeschaltet war, nur die Thrombin-Bande bei 35 kDa. Obwohl der zweite Ansatz 24 lang bei 25°C gelagert worden war, erfolgte offensichtlich keine Autolyse. Beim dritten Ansatz, der für 24 Stunden in Anwesenheit der aktiven bakteriellen Protease inkubiert worden war, war ein vollständiger Abbau der α -Thrombin-Bande unter Bildung des 25 kDa-Fragments zu beobachten. Dessen Entstehung war also nicht auf eine Autolyse des Thrombins, sondern auf die Aktivität der *Aeromonas hydrophila*-Protease zurückzuführen.

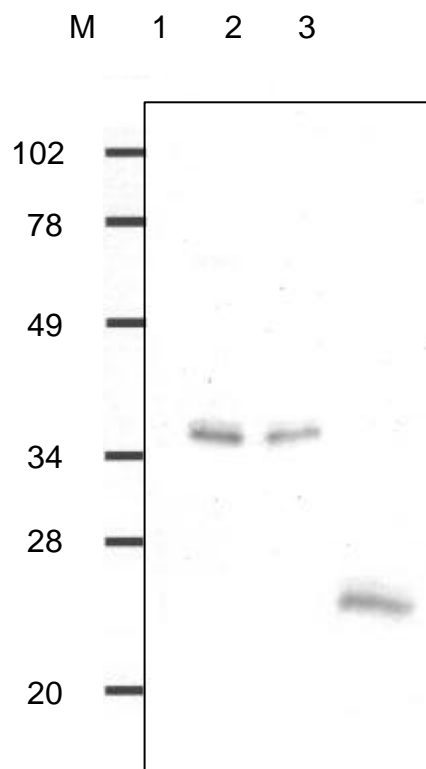


Abbildung 18: Untersuchungen zur Entstehung eines 25 kDa Spaltprodukts von Thrombin.

α -Thrombin wurde mit der Protease aus *Aeromonas hydrophila* inkubiert und der Ansatz anschließend in drei Aliquots aufgeteilt.

Spur 1: Aliquot, das sofort mit EDTA versetzt und bei – 80°C zwischengelagert wurde

Spur 2: Aliquot, das nach sofortiger EDTA-Zugabe für 24 Stunden bei 25 °C inkubiert wurde

Spur 3: Aliquot, das 1 Tag in Gegenwart der aktiven bakteriellen Protease bei 25 °C aufbewahrt wurde

Zur weiteren Analyse der Thrombin-Spaltung durch das bakterielle Enzym wurden 500 µl einer 5 µM α -Thrombin-Lösung in MES-Puffer (pH 6) ohne bzw. mit der *Aeromonas hydrophila*-Protease (10 nM) 60 Minuten lang bei 25°C inkubiert. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung von je 50 µl der Proben und dem Transfer auf PVDF-Membran, wurden die Proteine durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. Abbildung 19 zeigt das erhaltene Bandenmuster.

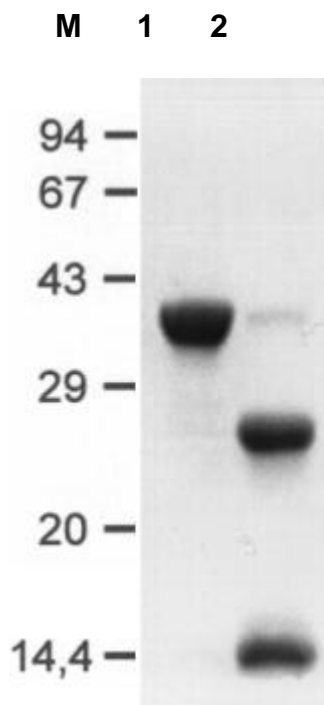


Abbildung 19: Spaltung von humanem α -Thrombin durch das bakterielle Enzym. Neben dem Molmassenstandard (M), wurden Inkubationsansätze in Abwesenheit (1) und Gegenwart (2) der Protease aus *Aeromonas hydrophila* aufgetragen.

Im Falle des Ansatzes ohne das bakterielle Enzym zeigte sich erwartungsgemäß die Thrombin-Bande bei 35 kDa. Dahingegen war in dessen Gegenwart ein weitgehender Abbau des α -Thrombins zu beobachten. Neben dem aktiven Spaltprodukt bei 25 kDa trat eine weitere Proteinbande bei 14 kDa in Erscheinung, die nicht affinitätsmarkierbar war. Diese Bande wurde zur Bestimmung der Nterminalen Aminosäuresequenz durch das Sequenzierungsverfahren nach Edman (1975) ausgeschnitten.

Die ersten 13 Reste wurden analysiert (VGKGQPSVLQVVN) und die entsprechende Spaltstelle der bakteriellen Protease in α -Thrombin (bzw. Prothrombin) lokalisiert. Sie liegt zwischen Asn₄₇₁-Val₄₇₂ und somit, wie erwartet, C-terminal vom Histidin-Rest des aktiven Zentrums.

Enzymatische Aktivität von α -Thrombin und seiner von der bakteriellen Protease erzeugten Spaltprodukte

Zum Vergleich der Aktivitäten von α -Thrombin bzw. dem affinitätsmarkierbaren 25 kDa-Spaltprodukt bezüglich der amidolytischen Spaltung des Thrombin-spezifischen Peptidsubstrates und der Wirkung im Gerinnungssystem des Plasmas, wurden chromogene Aktivitätstests (Kap. 2.3.10) und Messungen der Gerinnungszeit (Kap. 2.4) jeweils in Dreifachbestimmung durchgeführt.

Im Rahmen der chromogenen Aktivitätstest wurden je 10 μ l der oben beschriebenen Inkubationsansätze des Thrombins mit bzw. ohne bakterielles Enzym zunächst mit MES-Puffer auf 50 μ l verdünnt und dann mit 50 μ l des Substrats S2238 (1 mM) vermischt. Der zeitliche Verlauf der Absorption bei 405 nm wurde verfolgt und die erhaltenen Steigungen der Messkurven verglichen.

Für die Gerinnungsanalyse wurden je 100 μ l Citrat-haltiges humanes Normalplasma mit 100 μ l MES-Puffer in einem Koagulometer nach Schnitger und Cross auf 37°C vorgewärmt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von je 100 μ l der Inkubationsansätze gestartet und die Gerinnungszeiten bestimmt.

Sowohl im chromogenen Aktivitätstest, als auch bei der Messung der Gerinnungszeit zeigten α -Thrombin bzw. dessen Spaltprodukte gleiche Aktivität.

Ähnlich wie im Falle der Thrombin-Spaltung durch die humane Leukozyten-Elastase, sind die 25 kDa bzw. 14 kDa schweren Thrombin-Fragmente nach Prozessierung durch das bakterielle Enzym vermutlich noch über nichtkovalente Wechselwirkungen assoziiert (Brower et al., 1987). Bedingt dadurch bleibt die Struktur des aktiven Zentrums erhalten, was sich in einer unverminderten enzymatischen Aktivität hinsichtlich der Spaltung von Fibrinogen oder künstlicher Peptidsubstrate äußert.

Ein weiterer Hinweis auf einen nichtkovalenten Komplex der beiden Thrombin-Fragmente und die Aufrechterhaltung des aktiven Zentrums war, dass nach Vorinkubation mit biotinyliertem PPACK im Western-Blot das 25 kDa-Spaltprodukt sichtbar war. Die Affinitätsmarkierung des Histidin-Restes des aktiven Zentrums, der sich nach der Spaltung auf dem größeren Fragment befand, durch das biotinyliertes Chlormethylketon war gemäß dem Mechanismus nach Powers et al. (1977) nur unter Beteiligung des Serin-Restes möglich. Dieser war aber Teil des 14 kDa schweren Reaktionsprodukts. Offensichtlich haften die beiden Fragmente nach der Thrombin-

Spaltung durch die bakterielle Protease noch aneinander und die Struktur des aktiven Zentrums bleibt intakt, was die Affinitätsmarkierung des Histidin-Rests ermöglichte. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der Proteine ließ sich deshalb dann die markierte 25 kDa-Bande im oben beschriebenen Western-Blot nachweisen, wohingegen das 14 kDa-Fragment kein Signal lieferte.

3.2.2 Untersuchung der Spaltung anderer Proteine

Die Zugabe des bakteriellen Prothrombin-Aktivators zu humanem Plasma führt nicht zu einer Verkürzung der Gerinnungszeiten unter den in Kapitel 3.2.1.1 beschriebenen Bedingungen. Da ca. 10 % der Plasmaproteine zur Klasse der Proteaseinhibitoren gehören, wurde erwartet, dass ein sehr effizienter Plasma-Proteaseinhibitor die proteolytische Aktivität des Enzyms hemmt. Die im Folgenden beschriebenen Experimente erlauben den Schluss, dass es sich hierbei um α_2 -Makroglobulin handelt.

Konstante Mengen der Protease (50 nM) wurden mit einer Verdünnungsreihe (1 μ M – 1 nM) gereinigtem, kommerziell erworbenen α_2 -Makroglobulin 15 Minuten lang inkubiert. Anschließend wurde Prothrombin (1 μ M) zugesetzt. Solange das bakterielle Enzym im stöchiometrischen Überschuss gegenüber dem Inhibitor vorlag (ein Molekül α_2 -Makroglobulin kann zwei Enzymmoleküle einschließen), erfolgte die Bildung von Thrombin aus Prothrombin. Die Entstehung des Thrombins wurde über die simultane Zugabe und Umsetzung des chromogenen Peptid-Substrats für Faktor IIa gemessen. Lag das bakterielle Enzym hingegen im Unterschuss vor, wurde Prothrombin nicht mehr aktiviert.

Die gleichen Resultate zeigten sich in einem fluorogenen Aktivitätstest. Eine Verdünnungsreihe der bakteriellen Protease (300 nM – 1 nM) wurde mit 1 μ l humanem Plasma in 50 μ l 20 mM MES-Puffer (pH 6) für 10 Minuten inkubiert. Die Endkonzentration des α_2 -Makroglobulins (Plasmakonzentration ca. 3 μ M) betrug in diesem Experiment 60 nM. Anschließend wurde EDTA zugegeben (1 mM) und die Bildung aktiver Prothrombin-Spaltprodukte durch Zugabe von 50 μ l des fluorogenen Substrates und Messung des Fluoreszenzanstiegs analysiert. Solange die bakterielle Protease im Unterschuss gegenüber α_2 -Makroglobulin vorlag, wurde kein Signal registriert. Erst nachdem die im Plasma enthaltene Menge des Inhibitors im Verhältnis 2 zu 1 überstituiert wurde, erfolgte die Thrombin-Bildung.

Überraschend war allerdings die Beobachtung, dass bei Messung der Gerinnungszeit in einem Koagulometer nach Schnitger und Gross (Kap. 2.4) auch bei einem Überschuss der *Aeromonas hydrophila*-Protease gegenüber α_2 -Makroglobulin keine Gerinnsel-Bildung zu beobachten war. Daraus wurde die Vermutung abgeleitet, dass das bakterielle Enzyme neben Prothrombin und α -Thrombin auch noch andere Gerinnungsfaktoren bzw. Plasmaproteine spaltet und somit den Vorgang der Blutgerinnung beeinflusst.

Protein	Spaltung
Humanes Prothrombin	+
Humanes Thrombin	+
Humaner tissue factor	-
Humaner Faktor V	-
Humaner Faktor VII	-
Humaner Faktor VIII	+
Humaner Faktor IX	+
Humaner Faktor X	+
Humaner Faktor XI	+
Humaner Faktor XIII	+
Humanes Serumalbumin	+
Bovines Serumalbumin	-
Bovines Thrombin	+
Humanes Fibrinogen	+
Humanes Fibrin	+
Antithrombin III	+
Kollagen S	-
PHBSP	+

Tabelle 5: Qualitative Analyse der Spaltung von Plasmaproteinen durch die *Aeromonas hydrophila*-Protease. Je 2-4 μg der aufgelisteten Proteine wurden in Gegenwart bzw. Abwesenheit des bakteriellen Enzyms für eine Stunde bei 25°C inkubiert und die Ansätze über SDS-PAGE oder Western-Blot analysiert.
(+) Spaltung, (-) keine Spaltung

Daher wurden verschiedene Proteine, die in reiner Form erhältlich waren, im Hinblick auf eine Spaltung durch die bakterielle Protease analysiert (Tabelle 5). 2-4 μg (? 0,2-2 μM) des betreffenden Proteins wurden in Gegenwart bzw. Abwesenheit des Enzyms (10 nM) in 30 μl 20 mM MES-Puffer (pH6) für 2 Stunden bei 25 °C inkubiert. Anschließend wurde EDTA (1 mM) zugesetzt und die Reaktionsansätze durch SDS-

PAGE (Abbildung 21) bzw. in einigen Fällen durch Western-Blots (Kap. 2.3.2) analysiert. Von den 18 getesteten Proteinen wurden 13 gespalten.

Die Tatsache, dass auch humanes Fibrinogen gespalten werden kann, könnte die zuvor beschriebene Ungerinnbarkeit des Plasmas erklären. Abbildung 20 zeigt ein SDS-Gel mit Inkubationsansätzen des Fibrinogens (200 nM) ohne bzw. mit Zusatz des bakteriellen Enzyms (10 nM). Zum Vergleich wurden Fibrinogen (200 nM) und α -Thrombin (10 nM) in 30 μ l 50 mM Tris/HCl-Puffer (pH 8,5) unter den oben beschriebenen Bedingungen inkubiert.

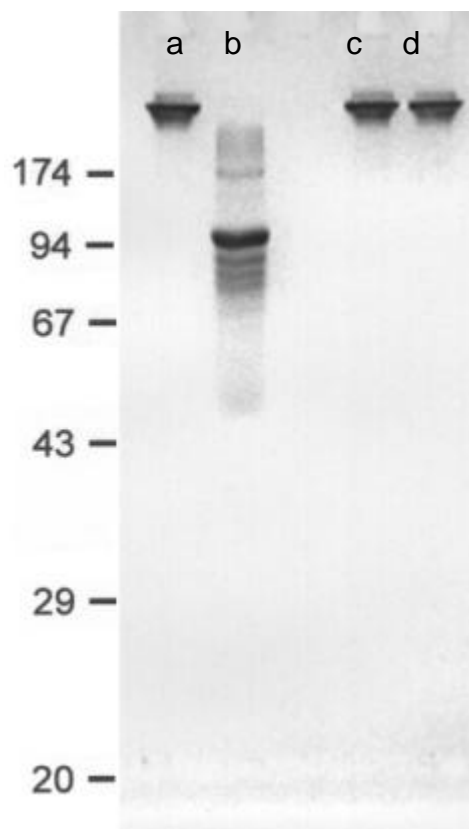


Abbildung 20: Fibrinogen-Spaltung durch das bakterielle Enzym bzw. durch α -Thrombin.

- (a) und (c) Fibrinogen,
- (b) Fibrinogen, inkubiert mit dem bakteriellen Enzym,
- (d) Fibrinogen, inkubiert mit α -Thrombin

Nach gelelektrophoretischer Auftrennung zeigte sich beim Inkubationsansatz des Fibrinogens mit Thrombin eine Bande, die erwartungsgemäß auf annähernd gleicher Höhe wie die des Fibrinogens lief. Thrombin spaltet von einem Molekül Fibrinogen (Molekulargewicht 340 kDa) zwei Fibrinopeptide A (je 16 Aminosäuren) und zwei Fibrinopeptide B (je 14 Aminosäuren) unter Ausbildung eines Fibrin-Monomers ab (Blombäck et al., 1977; Stubbs et al., 1992). Damit geht eine geringfügige Verringe-

rung des Molekulargewichts einher, die im SDS-Gel nicht erkennbar war. Dahingegen zeigte sich im Falle des Inkubationsansatzes von Fibrinogen mit der *Aeromonas hydrophila*-Protease neben anderen Spaltprodukten eine prominente Bande bei einem apparenten Molekulargewicht von 95 kDa. Offensichtlich wird Fibrinogen durch das bakterielle Enzym auf eine andere Weise als durch α -Thrombin gespalten.

Die Fibrinogen-Spaltung wurde auch mit Hilfe eines Koagulometers nach Schnitger und Gross untersucht. Hierbei wurden 100 μ l einer Fibrinogen-Lösung (3 mg/ml) mit 100 μ l 20 mM MES-Puffer (pH 6) vermischt und auf 37 °C temperiert. Die Messung der Gerinnungszeit wurde nach Zugabe von 100 μ l einer Lösung (125 ng/ml) des bakteriellen Enzyms gestartet. Als Positivkontrolle diente eine Thrombin-Lösung (125 ng/ml). Während Thrombin eine rasche Gerinnung bewirkte, war das bei dem bakteriellen Enzym nicht der Fall. Offenbar führt die Spaltung humanen Fibrinogens durch die Protease aus *Aeromonas hydrophila* zu Spaltprodukten, welche nicht in der Lage sind zu polymerisieren.

Antithrombin III (AT III) wird durch das bakterielle Enzym gespalten und inaktiviert, so dass es in chromogenen Aktivitätstests die Thrombin-Aktivität unter den im Folgenden beschriebenen Bedingungen nicht mehr inhibieren kann:

AT III (10 nM) wurde in Gegenwart (1 nM) bzw. Abwesenheit des Enzym aus *Aeromonas hydrophila* für 30 Minuten in 30 μ l 20 mM MES-Puffer (pH 6) bei 25 °C inkubiert und anschließend EDTA (1 mM) zugesetzt. Je 10 μ l der Ansätze wurden mit MES-Puffer, der 1 U/ml Heparin und α -Thrombin (Endkonzentration 1 nM) enthielt, auf 50 μ l verdünnt und 30 min bei 25°C inkubiert. Nach Zugabe von 50 μ l des chromogenen Substrats S2238 (1 mM) wurde dann die Freisetzung von *p*-Nitroanilin in Abhängigkeit von der Zeit photometrisch gemessen. Im Falle des Ansatzes, bei dem Thrombin mit intaktem AT III vorinkubiert wurde, zeigte sich eine Hemmung der Thrombin-Aktivität bis auf 3,2 % des Wertes einer als Vergleich gemessenen Thrombin-Lösung ohne AT III. Dahingegen zeigte sich bei dem Inkubationsansatz des α -Thrombins mit dem gespaltenen AT III eine Restaktivität von 95,6 % des Referenzwerts.

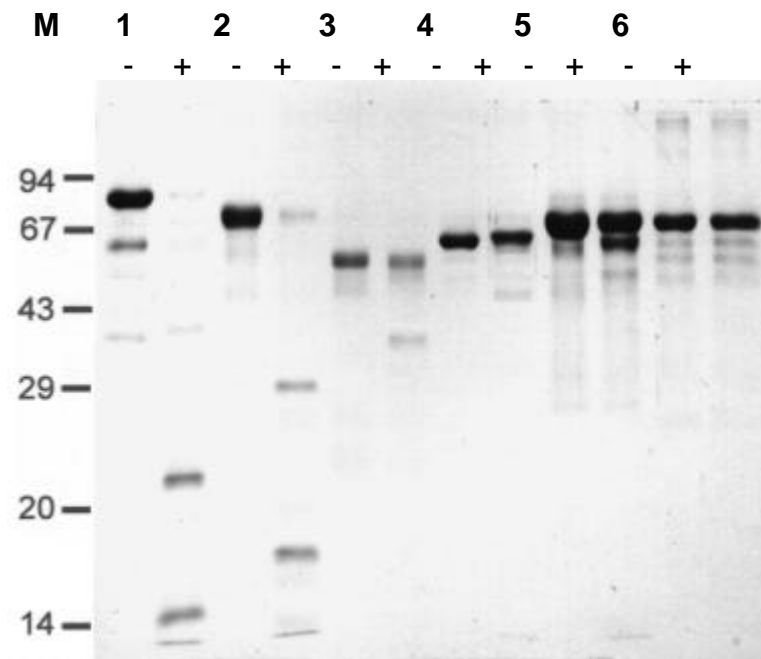


Abbildung 21: Spaltung von Plasmaproteinen durch die bakterielle Protease.

(M) Molmassenstandard,

(+) Inkubationsansätze in Gegenwart des Enzyms, (-) Ansätze ohne Enzym,

(1) Prothrombin, (2) Faktor IX, (3) Faktor X, (4) Antithrombin III, (5) HSA, (6) BSA

3.3 Charakterisierung des Prothrombin-Aktivators

3.3.1 Sequenzanalyse der *Aeromonas hydrophila*-Protease

3.3.1.1 Aminoterminaler Sequenzanalyse nach Edman

Zur Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz des bakteriellen Enzyms wurde eine Sequenzierung nach Edman (1975) durchgeführt.

Ausgangspunkt waren die vereinigten Fraktionen nach der Gelfiltration, die den Prothrombin-Aktivator in reiner Form enthielten. Für die Untersuchung wurden 1,3 µg (? 36 pmol) der *Aeromonas hydrophila*-Protease eingesetzt. Nach einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese folgte der Elektrotransfer auf eine Polyvinylidenfluoridmembran (Kap. 2.3.3). Durch Coomassie-Färbung wurde die Bande des bakteriellen Enzyms sichtbar gemacht. Nach dem Waschen und Trocknen der Transfermembran wurde die Bande ausgeschnitten und für den automatisierten Edman-Abbau eingesetzt (Kap. 2.3.4). Dieser erfolgte mit einem Amino Acid Sequencer Pro-cise 492, verbunden mit einem Online PTH-Analyzer 140C und dem UV Detektor

785A. Die Menge des sequenzierbaren Proteins betrug 10 pmol (28% der ursprünglich eingesetzten Menge). Die ersten 25 Nterminalen Aminosäurereste wurden ermittelt und sind in Abbildung 22 dargestellt.



Abbildung 22: N-terminale Sequenzanalyse des Prothrombin-Aktivators aus *Aeromonas hydrophila*. Dargestellt ist die Sequenz der ersten 25 ermittelten Aminosäurereste.

Datenbankrecherchen ergaben eine 92 %ige Sequenzidentität mit einem Enzym namens „Pro-Aminopeptidase Processing Protease“ aus *Aeromonas caviae* (Nirasawa et al., 1999), das eine bakterielle Pro-Aminopeptidase aktivieren kann. In der EMBL-Datenbank ist die Nukleotidsequenz dieses Proteins unter der Zugriffsnummer AB024302 hinterlegt. Die Pro-Aminopeptidase Processing Protease wird als Präproprotein gebildet, das aus 4 Domänen mit 590 Aminosäureresten besteht. Am Aminoterminus zeigt sich eine 19 Aminosäurereste lange Signalsequenz, gefolgt von einem Propeptid aus 165 Aminosäuren. Daran schließen sich die reife Region und ein weiteres Propeptid am C-Terminus an. Die Propeptide können autokatalytisch entfernt werden. Das reife Enzym weist ein Molekulargewicht von 30 kDa auf.

Ferner zeigte sich eine Sequenzidentität von 92 % mit einer Protease aus *Aeromonas hydrophila*, die Elastase-ähnliche Aktivität hat (Cascon et al., 2000). Sie wird als Präproprotein mit einem Molekulargewicht von 62,7 kDa und einer Länge von 588 Aminosäureresten gebildet. Auf eine 19 Aminosäurereste lange Signalsequenz folgt ein N-terminales Propeptid mit 164 Aminosäuren. Die restlichen 405 Reste verteilen sich auf die reife Region und ein Propeptid am C-Terminus. Die aktive Protease ist, ähnlich wie der im Rahmen der vorliegenden Arbeiten gefundene Prothrombin-Aktivator thermostabil und weist ein Molekulargewicht von 38 kDa auf.

Die Nukleotidsequenz der Elastase findet sich in der EMBL-Datenbank unter der Zugriffsnummer AF193422.

Die Sequenzübereinstimmung des Prothrombin-Aktivators mit der Pro-Aminopeptidase Processing Protease aus *Aeromonas caviae* bzw. der Elastase aus *Aeromonas hydrophila* ergibt sich jeweils am N-Terminus der reifen Region.

Darüber hinaus ergab sich eine 55-60 %ige Sequenzhomologie zu Metalloprotease-Vorläufern aus *Vibrio proteolyticus*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio chole-*

rae und *Pseudomonas aeruginosa* (David et al., 1992; Hase & Finkelstein, 1991; Cheng et al., 1996; Milton et al., 1992; Fukushima et al., 1989).

3.3.1.2 Bestimmung der vollständigen Sequenz

Analyse des zentralen Bereichs des Strukturgens

Die Bestimmung der vollständigen Sequenz erfolgte auf DNA-Ebene. Auf Grundlage der ermittelten ersten 25 Nterminalen Aminosäurereste des Prothrombin-Aktivators und der bekannten Aminosäure- bzw. DNA-Sequenzen der homologen Proteine (Pro-Aminopeptidase Processing Protease aus *Aeromonas caviae*, Elastase aus *Aeromonas hydrophila*, Proteasen aus *Vibrio proteolyticus*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio cholerae* und *Pseudomonas aeruginosa*) wurden die beiden Primer TK-1 und TK-2 (Abb. 23) mit einer Länge von je 21 Basen entworfen. Hierbei wurden Bereiche mit möglichst hoher Übereinstimmung der oben beschriebenen Sequenzen ausgewählt.

TK-1	CAA GAC CGG CAA GTA TTT CTA
TK-2	ACG TAG AGA TCC GCA TCC CCG
TK-3	AGG TCG CGT GAT TGA GGT TGA
TK-4	TCA ACG CCT CCT GTG GTA CCA

Abbildung 23: Die für PCR-Reaktionen und Sequenzierungen eingesetzten Primer.

Mit diesen Primern wurde ein zentraler Abschnitt des Strukturgens des Prothrombin-Aktivators, der den Großteil der reifen Region und des C-terminalen Propeptids umfasste, durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert (Kap. 2.2.7). Falls das Strukturgens im gesamten Bereich eine hohe Sequenzidentität zu den bereits publizierten Sequenzen der Pro-Aminopeptidase Processing Protease bzw. Elastase aufweisen sollte, war mit der Bildung eines 1000 bp langen PCR-Produktes zu rechnen.

Für die Amplifikation wurden 1 µl einer *Aeromonas hydrophila*-Kultur, die beiden Primer und dNTP's in Endkonzentrationen von 1 bzw. 250 µM eingesetzt. Die durch das *Taq/Pfu*-Polymerase-Gemisch katalysierte Reaktion wurde im Thermocycler bei einer Annealing-Temperatur von 51°C durchgeführt.

Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung des Reaktionsansatzes (Kap. 2.2.2), zeigte sich bei UV-Bestrahlung ein DNA-Fragment der erwarteten Größe von annähernd 1000 bp (Abbildung 24).

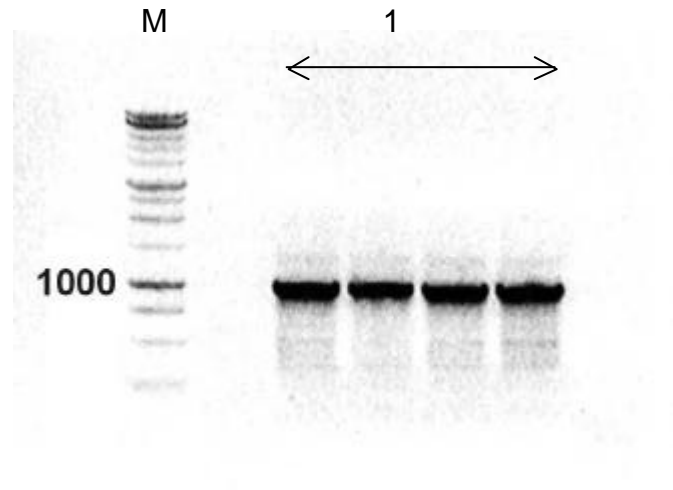


Abbildung 24: Agarose-Gel (als Negativ gezeigt) mit elektrophoretisch aufgetrennten PCR-Ansätzen (1), die mit *Aeromonas hydrophila*-DNA und den Primern TK-1 und TK-2 durchgeführt wurden. Das erhaltene 1000 bp PCR-Produkt umfasst den zentralen Teil des Strukturgens des Prothrombin-Aktivators. Das aus dem Gel isolierte Genfragment wurde zur DNA-Sequenzierung eingesetzt.
(M) DNA-Molekulargewichts-Marker

Zur Sequenzierung nach der von Sanger et al. (1977) beschriebenen Kettenabbruchmethode wurden in zwei Ansätzen je 100 ng des aus dem Gel isolierten DNA-Fragments und 10 pmol der Primer TK1 bzw. TK2 eingesetzt. Das Ergebnis der Sequenzierungen ist in Abbildung 29 dargestellt.

Analyse der Randbereiche

Das prinzipielle Vorgehen zur Sequenzbestimmung der noch unbekannten Bereiche am 5'- bzw. 3'- Ende des Strukturgens ist in Abbildung 25 gezeigt. Zur Vorbereitung wurde das gesamte Strukturgen des Prothrombin-Aktivators mit Hilfe einer Restriktionsendonuklease aus der chromosomalen DNA von *Aeromonas hydrophila* herausgeschnitten (Kap. 2.2.3). Das erhaltene Genfragment wurde dann mit T4-DNA-Ligase zirkularisiert (Kap. 2.2.4). Anschließend wurden die noch unbekannten Abschnitte des Strukturgens mit Hilfe einer inversen PCR-Reaktion amplifiziert und dann sequenziert. Hierbei kamen die auf Grundlage bereits bekannter Genabschnitte entworfenen Primer TK-3 und TK-4 (Abb. 23) zum Einsatz. Diese waren ausgehend von

dem bereits bekannten, zentralen Teil des Strukturgens hin zu den zu analysierenden Randbereichen gerichtet.

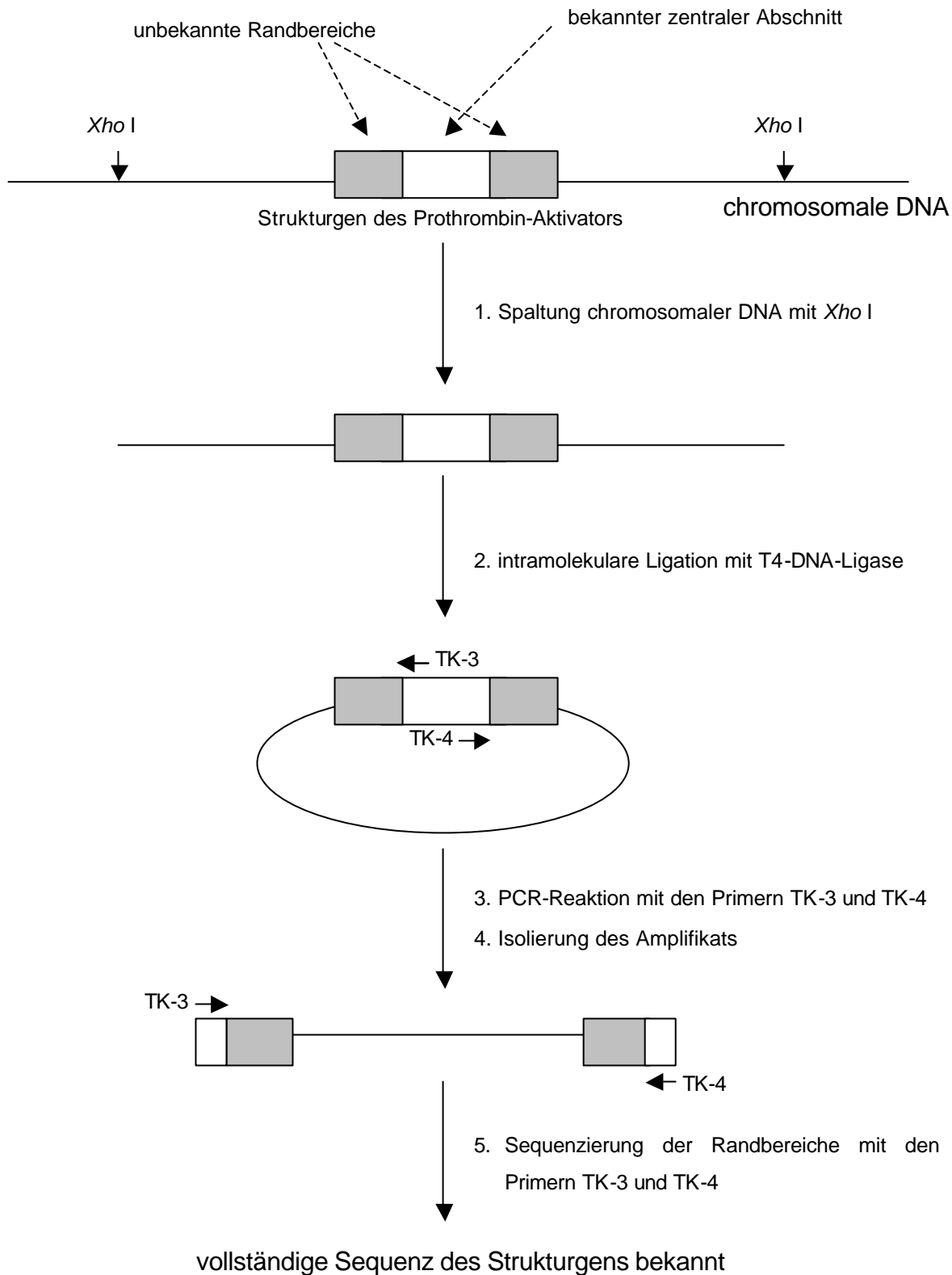


Abbildung 25: Schematische Darstellung des Vorgehens zur Analyse der Randbereiche am 3'- bzw. 5'-Ende des Strukturgens des Prothrombin-Aktivators. Weitere Erläuterungen im Text.

Anhand der bisherigen Ergebnisse war zu vermuten, dass das Strukturgen des Prothrombin-Aktivators über seine gesamte Länge eine hohe Sequenzidentität mit den publizierten Sequenzen der Pro-Aminopeptidase Processing Protease aus *Aeromonas caviae* und Elastase aus *Aeromonas hydrophila* aufwies. Das Restriktionsenzym *Xho* I hat keine Spaltstelle im Bereich der Strukturgene der beiden zum Prothrombin-Aktivator homologen Proteine. Es war zu erwarten, dass dies auch für das hier zu untersuchende Strukturgen zutraf. Deshalb wurde *Xho* I für das Herausschneiden des Strukturgens des Prothrombin-Aktivators aus der chromosomalen DNA ausgewählt. Die Erkennungssequenz und Spaltstellen von *Xho* I sind in Abbildung 26 gezeigt.

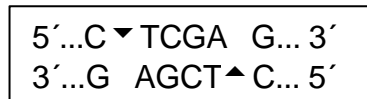


Abbildung 26: Erkennungssequenz und Spaltstellen (▲, ▼) der Restriktionsendonuklease *Xho* I.

Um den Anteil anderer Spaltprodukte neben dem DNA-Fragment, das das Strukturgen des Prothrombin-Aktivators trägt zu minimieren, wurde zunächst die Größe des gesuchten DNA-Bruchstückes in einem analytischen Ansatz durch Southern-Blot-Untersuchungen ermittelt.

Später wurde eine *Xho* I – Spaltung von genomischer *Aeromonas hydrophila*-DNA im präparativen Maßstab durchgeführt. DNA-Fragmente im gesuchten Größenordnungsbereich wurden dann zur teilweisen Reinigung nach elektrophoretischer Auftrennung des Reaktionsansatzes aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten und extrahiert (Kap. 2.2.2.2).

Im Rahmen eines analytischen Ansatzes wurden zu diesem Zweck je 1 µg *Aeromonas hydrophila*-DNA mit 5 U des Restriktionsenzym in dem vom Hersteller empfohlenen Puffersystem inkubiert. Zur Lokalisierung des Strukturgens des Prothrombin-Aktivators wurde ein Southern-Blot durchgeführt.

Hierzu wurde der Reaktionsansatz auf ein analytisches Agarosegel (Kap. 2.2.2.1) aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Kapillartransfer (Kap. 2.2.9.1) der Genfragmente auf Nitrozellulose (Sambrook et al., 1989), erfolgte die Hybridisierung einer biotinylierten Gensonde (Kap. 2.2.9.2), die komplementär zu dem bereits bekannten zentralen Abschnitt des Strukturgens war.

Diese Gensonde war mit Hilfe des PCR DIG probe synthesis kit (Roche, Mannheim) und der Primer TK-1 bzw. TK-2 nach dem Herstellerprotokoll durch Polymerase-Kettenreaktion synthetisiert worden (Kap. 2.2.8).

Die immunologische Detektion des Strukturgens über die hybridisierte Sonde erfolgte mit Hilfe des DIG nucleic acid detection kit (Roche, Mannheim) nach dem Protokoll des Herstellers (Kap. 2.2.9.3). Nach Inkubation mit einem Anti-DIG-alkalische Phosphatase-Konjugat, das an die Digoxigenin-Reste binden konnte, wurde die von der Alkalischen Phosphatase katalysierte Redoxreaktion zwischen NBT und BCIP durchgeführt. Die Bildung eines blauen Präzipitats zeigte das Vorhandensein eines DNA-Fragments mit einer Länge von annähernd 6500 bp an, das das Strukturgens des Prothrombin-Aktivators beinhaltet (Abbildung 27).

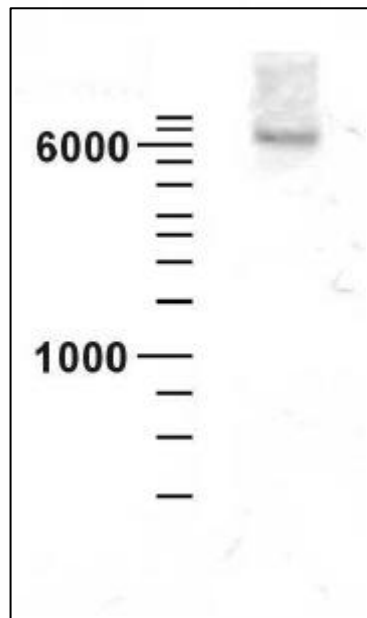


Abbildung 27: Southern-Blot-Analyse genomischer *Aeromonas hydrophila*-DNA, die mit *Xho* I gespalten wurde, zur Lokalisierung des Strukturgens des Prothrombin-Aktivators. Das gesuchte Strukturgens ist in einem DNA-Fragment enthalten, das eine Größe von annähernd 6500 bp aufweist.

5 µg *Aeromonas hydrophila*-DNA wurden im Rahmen eines präparativen Ansatzes mit 20 U *Xho* I für 2 Stunden in einem vom Hersteller empfohlenen Puffersystem inkubiert. DNA-Fragmente im Bereich von 6500 bp wurden nach der elektrophoretischen Auftrennung des Reaktionsansatzes aus einem Agarosegel mit dem QIAquick gel extraction Kit isoliert.

Um die intramolekulare Ligation zu begünstigen, wurden die isolierten DNA-Fragmente in hoher Verdünnung für die nachfolgende Ligierung eingesetzt. 1 µl der

Fragmentlösung wurde mit 1,5 U T4-DNA-Ligase (NEB) für 48 h bei 15 °C in einem vom Hersteller empfohlenen Puffer und einem Gesamtvolumen von 20 µl inkubiert.

Zur Aufklärung der Sequenz in den noch unbekannten Randbereichen des Strukturgens des Prothrombin-Aktivators, wurde eine Polymerase-Kettenreaktion mit dem Ligationsansatz in Gegenwart der Primer TK-3 und TK-4 durchgeführt. Diese waren von dem bereits sequenzierten, zentralen Teil hin zu den noch unbekannten Enden gerichtet. Die Anwesenheit ringförmiger DNA-Moleküle mit dem zu untersuchenden Strukturgen im Ligationsansatz bestätigte sich durch die Bildung eines PCR-Produkts der erwarteten Größe von ungefähr 6000 bp (Abbildung 28).

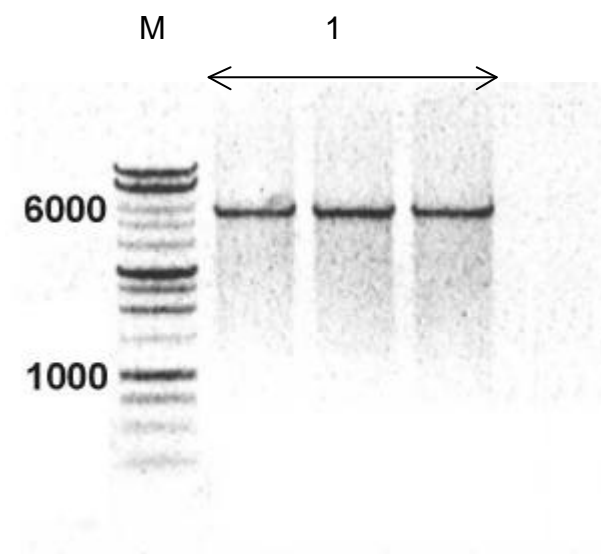


Abbildung 28: Agarosegel (als Negativ gezeigt) mit elektrophoretisch aufgetrennten PCR-Ansätzen (1), die mit dem Ligationsansatz und den Primern TK-3 und TK-4 durchgeführt wurden. Erwartungsgemäß zeigte sich ein 6000 bp großes PCR-Produkt, das nach seiner Isolierung aus dem Gel für Sequenzierungen eingesetzt wurde. (M) DNA-Molekulargewichts-Marker

Zwei Sequenzierungsansätze wurden nach der Kettenabbruchmethode von Sanger (Kap. 2.2.6) mit je 50 ng des PCR-Amplifikats und 10 pmol der Primer TK-3 bzw. TK-4 durchgeführt. Durch die so bestimmte Sequenz der Randbereiche, in Kombination mit dem bereits ermittelten zentralen Abschnitt, konnte die gesamte DNA-Sequenz des Prothrombin-Aktivator-Strukturgens aufgeklärt werden. Davon ausgehend ließ sich dann auch die vollständige Aminosäuresequenz ableiten. Die Sequenzen sind in Abbildung 29 gezeigt. Die Positionen und Richtungen der für die PCR-Reaktionen und Sequenzierungen eingesetzten Primer sind durch Pfeile neben ihren Bezeichnungen wiedergegeben.

```

1 - ATGAACAAAAGTGTATTTGGCCGTGGTATTGGCCTGCTCGGGAAAGCGCAGCCTTGGCTGCA - 60
1 - M N K V Y L A V V L A C S G S A A L A A

61 - GAACAGGTAGAAAGTGCATCAGGTGCGCCGGCATTACAGGAGCACCGAGCGGCGCTGCCGGT - 120
21 - E Q V E V H Q V A G I Q G A P S G A A G

121 - GTCAGCGCTCTGGCAGGAGATGGCGAGTTTCGTCAGGTACGGGTAGTCAAAGTTGCCCAAT - 180
41 - V S A L A G D G E F R Q V R V V K L P N

181 - GGCCAGCAGCGGGTTCGCTATGAGCAAAACCTGGCGCGGCATTCCGGTTTGGGGTCAGGTG - 240
61 - G Q Q R V R Y E Q T W R G I P V W G Q V

241 - CTGGTGGCCGAACAGTCTCTCGGTGGGCAGATAAGCCAGGTTTCCGGCCAGATGTTGCGC - 300
81 - L V A E Q S L G G Q I S Q V S G Q M L R

301 - CAGATTGATGCCGACGTGGCCAGCCCGACCGCCGCCCTGTGCGCCGGTTGACGCTGCTGGC - 360
101 - Q I D A D V A S P T A A L S P V D A A G

361 - AAGGCCCGTGCCGGGGCCAAGGGCAGCAACGAGCGGGTCAAAGCTGTTCTGTGATGCAGGAT - 420
121 - K A R A G A K G S N E R V K L F V M Q D

421 - GAGGCAGGTCAGGCTCGTCTGGTCTATCTGGTCTCCTGGCTGGCGGCAAGCGAAAGAGCCG - 480
141 - E A G Q A R L V Y L V S W L A A S E E P

481 - AGCCGCCCCCTTCGTGGTGATCGATGCCCAGAGCGCGCCGAACCTCAAAGCGTTGGGAGGGG - 540
161 - S R P F V V I D A Q S G A E L K R W E G

541 - ATCAACCACAAGGATGCCACAGGCCCCGGGTGGCAACATCAAAGACTGGCAAGTACTTCTAT - 600
181 - I N H K D A T G P G G N I K T G K Y F Y

601 - GGCGCGGACTTCGGCCCCCTGCTGGTGGATGACAGCTGCCGCATGACCAGCCCCGAACGTG - 660
201 - G A D F G P L L V D D S C R M T S P N V

661 - GATACCATCAAACCTCAATCACGCGACCTCGGGTGGTGCCGTGCACCAAGTTCACCTGCCCCG - 720
221 - D T I N L N H A T S G G A V H Q F T C P

721 - GAGAACACGGTCAAGGAGATCAATGGCGCCTACTCGCCGCTCAAACGATGCCCCACTACTTC - 780
241 - E N T V K E I N G A Y S P L N D A H Y F

781 - GGCAATGTTGTGTTCAACATGTATCGCAACTGGTACAACACGGCGCCGCTCAACTTCAAG - 840
261 - G N V V F N M Y R N W Y N T A P L N F K

841 - CTGAAGATGCGGGTGCACTACAGTCGCAACTATGAAAATGCCTTCTGGGACGGCAGCCAG - 900
281 - L K M R V H Y S R N Y E N A F W D G S Q

901 - ATGACCTTCGGGGATGGTGCTACCACCTTCTATCCGCTGGTGAGCCTGGACGTGGCGGCC - 960
301 - M T F G D G A T T F Y P L V S L D V A A A

961 - CATGAGGTGAGCCACGGCTTTACCGAACAGAACTCGGGGCTGGTCTATTCCGGTCAGTCA - 1020
321 - H E V S H G F T E Q N S G L V Y S G Q S

1021 - GGTGGCATCAACGAAGCTTTCTCCGACATGGCGGTGGAAAGCGGCCGAGAACTACATGAAG - 1080
341 - G G I N E A F S D M A V E A A E N Y M K

1081 - GGGCAGCAACGAACCTGGCTGGTGGGGGCCCCAAGATCTTCAAAGGGCAACGGGCTCCCTGCA - 1140
361 - G Q Q R T G W W G P K I F K G N G L P A

1141 - GCTACTTCGAGGATCCAACCCGGGAATGGCAGCTCCATCGGTGATGCCAGCGATTACTAC - 1200
381 - A T S R I Q P G N G S S I G H A S D Y Y

1201 - GATGGCATCGACGTGCACCACAGCTCGGGCGTCTACAATCGGGCCTTCTACCTGCTGGCC - 1260
401 - D G I D V H H S S G V Y N R A F Y L L A

```

```

1261 - AACACCAGTGGCTGGAACACCCGCAAGGCATTGGAAGTGTTTCGTGCTGGCCAACCGCCTC - 1320
421 - N T S G W N T R K A F E V F V L A N R L

1321 - TACTGGGGCGCCAACACCACCTACGATCAGGGTGCCTGTGGCGTGACCAAGGCGGCCACA - 1380
441 - Y W G A N T T Y D Q G A C G V T K A A T

1381 - GACCTGGGCTACAGCCTGACCGACGTGGCGGCAGCCTTTACTACTGTCTGGGGTCAACGCC - 1440
461 - D L G Y S L T D V A A A F T T V G V N A
      TK-4 -----
1441 - TCCTGTGGTACCAACGCCGCCACCGAGCGGCAGCGTGCTGCAAAACGGGGTCCCTGTGACC - 1500
481 - S C G T T P P P S G S V L Q N G V P V T

1501 - GGGCTCTCCGCCGCCAAGGGTGGCAAGGTGAACCTTCACTATCGACGTGCCGGCGCGGCAAG - 1560
501 - G L S A A K G G K V N F T I D V P A G K

1561 - AGCCAGCTGGTGGTCCGACGAGTGGCGGCACCGGGGATGCGGATCTCTACGTCAAAGTTT - 1620
521 - S Q L V V A S S G G T G D A D L Y V K F
      TK-2 -----
1621 - GGTTCCGGCTCCGACCAGCACCAGCTATGACTGCCGTCCCTTACAAGGGGGTAATGCAGAG - 1680
541 - G S A P T S T S Y D C R P Y K G G N A E

1681 - ACCTGTACCCTGAACTCGCCCCAAGGCGGGTACCTGGTATGTACAGCTGAGTGGTTACAGC - 1740
561 - T C T L N S P K A G T W Y V Q L S G Y S

1741 - GCCTTTTCGGGAGTGACCCCTCAAGGCAAGCTACTGA - 1776
581 - A F S G V T L K A S Y *

```

Abbildung 29: DNA- und Aminosäuresequenz des Prothrombin-Aktivators aus *Aeromonas*

hydrophila. Der durch Edman-Abbau ermittelte N-Terminus des reifen Enzyms ist mit durchgezogener Linie unterstrichen. Durch Pfeile über der Nukleotidsequenz sind die Positionen und Richtungen der für PCR-Reaktionen und Sequenzierungen eingesetzten Primer gekennzeichnet. Die Position eines Zinkfinger-Motivs ist durch eine gestrichelte Linie charakterisiert.

In guter Übereinstimmung mit den Daten für die Pro-Aminopeptidase Processing Protease aus *Aeromonas caviae* (Nirasawa et al., 1999) und Elastase aus *Aeromonas hydrophila* (Cascon et al., 2000), wurde eine Länge des Strukturgens von 1773 Nukleotiden bzw. 591 Aminosäureresten ermittelt.

Der bereits per Edman-Abbau sequenzierte N-terminale Teil der reifen Region des Proteins (Kap. 3.3.1.1) beginnt bei Lys₁₈₄. In Analogie zu den oben erwähnten, homologen Proteinen, zeigt sich ein Zinkfinger-Motiv im Bereich der Aminosäurereste Val₃₁₈ bis Phe₃₂₇, welches das aktive Zentrum beinhaltet (Nirasawa et al., 1999; Cummins et al., 1999).

Sowohl auf der DNA- als auch auf der Aminosäureebene besteht eine Sequenzidentität von über 90 % zwischen dem Prothrombin-Aktivator und der Elastase bzw. der Pro-Aminopeptidase Processing Protease. Vermutlich handelt es sich bei diesen drei Enzymen um Varianten eines Proteins in verwandten Organismen, wobei die Se-

quenzunterschiede auf geringfügige genetische Unterschiede der Organismen zurückzuführen sind.

Darüber hinaus zeigte sich eine Sequenzhomologie von 52-55 % mit Metalloproteasen aus *Vibrio proteolyticus*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio anguillarum* und *Pseudomonas aeruginosa*, die Zn^{2+} -Fingermotive und teils Elastase-ähnliche Aktivität aufweisen (David et al., 1992; Hase & Finkelstein, 1991; Cheng et al., 1996; Milton et al., 1992; Fukushima et al., 1989). Hierbei sind Sequenzbereiche mit hoher und solche mit geringer Homologie zu unterscheiden. Zu Abschnitten mit einer hohen Sequenzhomologie des Prothrombin-Aktivators, der Elastase, der Pro-Aminopeptidase Processing Protease und der oben erwähnten Metalloproteasen auf DNA- bzw. Aminosäureebene zählt beispielsweise das Zinkfinger-Motiv und das in diesem Bereich befindliche aktive Zentrum (Nirasawa et al., 1999; Cummins et al., 1999). Außerdem sind die Positionen der Cystein-Reste, die eine wichtige Rolle für die Aufrechterhaltung der nativen Raumstruktur der reifen Enzyme und / oder für die Katalyse spielen könnten, in allen Sequenzen konserviert.

3.3.2 Direkte Spaltung chromogener und fluorogener Substrate

Um eine mögliche Spaltung künstlicher Peptid-Substrate durch die Prothrombin-aktivierende Aktivität aus *Aeromonas hydrophila* auszuschließen, wurde der Einfluss des Enzyms auf chromogene und fluorogene Substrate von Faktor Xa, Thrombin und anderer aktiver Proteasen der Gerinnungskaskade (sowohl prokoagulatorische als auch antikoagulatorische) bzw. der Fibrinolyse (z.B. Plasmin) getestet.

Hierbei wurde der Prothrombin-Aktivator (Endkonzentration 10 nM) in 50 µl 20 mM MES-Puffer (pH 6) (Kap. 3.3.3) vermischt mit 50 µl einer 2 mM Lösung des Substrats. Insgesamt wurden 18 chromogene und 10 fluorogene Substrate eingesetzt. Nach Inkubationszeiten von über 2 Stunden wurden die Messungen abgebrochen. Bislang konnte keine direkte Spaltung eines chromogenen bzw. fluorogenen Substrates nachgewiesen werden.

Überraschend ist, dass alle getesteten Faktor Xa-spezifischen Substrate (S-2222, S-2765, Pefachrome Xa, Boc-Ile-Glu-Gly-Arg-AMC) kein registrierbares Signal lieferten, wenn sie mit der bakteriellen Protease unter Bedingungen inkubiert wurden, die sich als geeignet für die Prothrombin-Aktivierung erwiesen hatten. Eine direkte Spal-

tung der Faktor Xa-spezifischen Substrate durch die bakterielle Protease erschien möglich, da diese die Prozessierung von humanem Prothrombin zu α -Thrombin katalysiert, ähnlich wie der aktivierte Faktor X als Teil des Prothrombinase-Komplexes. Die eingesetzten Peptid-Substrate waren anhand authentischer Spaltstellen des Faktors Xa im Prothrombin entwickelt worden. Beispielsweise wurde das fluorogene Substrat Boc-Ile-Glu-Gly-Arg-AMC von der Sequenz des Prothrombins im Bereich der Faktor Xa-Spaltstelle zwischen Arg₃₂₀-Ile₃₂₁ (Abbildung 30) abgeleitet, an der auch die Protease aus *Aeromonas hydrophila* spaltet (Kap. 3.2.1). Die experimentell beobachtete Nichtumsetzung dieser Substrate durch den bakteriellen Prothrombin-Aktivator war deshalb unerwartet.

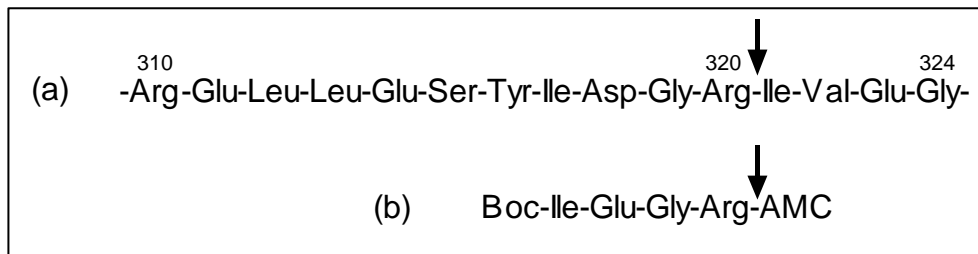


Abbildung 30: Vergleich der Aminosäuresequenz des Prothrombins (a) im Bereich einer Faktor Xa-Schnittstelle und der davon abgeleiteten Struktur eines fluorogenen, Faktor Xa-spezifischen Substrats (b). Pfeile markieren die Bindungen, die durch den aktivierten Faktor X gespalten werden.

Die Tatsache, dass die Thrombin-spezifischen Substrate (S-2238, Pefachrome Th, Boc-Val-Pro-Arg-AMC, Boc-Asp(Obzl)-Pro-Arg-AMC) erwartungsgemäß nicht umgesetzt wurden, gestattete eine störungsfreie Detektion der gebildeten aktiven Prothrombin-Spaltprodukte durch chromogene bzw. fluorogene Aktivitätstests auch in Gegenwart des bakteriellen Enzyms.

3.3.3 Bestimmung des pH-Optimums

Zur Bestimmung des pH-Optimums der bakteriellen Protease bezüglich der Aktivierung von Prothrombin wurde ein zweistufiger Aktivitätstest durchgeführt (Kap. 2.3.10.2). Hierbei wurde das Enzym (10 nM) mit Prothrombin in einer Endkonzentration von 1 μ M in 50 μ l der in Tabelle 6 aufgelisteten Puffer im pH-Bereich 4-9 für 10 Minuten vorinkubiert. Danach wurde die Aktivierungsreaktion durch EDTA-Zugabe (1 mM) gestoppt (siehe Kap. 3.3.7).

Puffersystem	pH-Bereich
10 mM Acetat	4,47 – 5,66
10 mM MES	5,77 – 6,45
10 mM PIPES	6,50 – 7,11
10 mM HEPES	7,08 – 7,89
10 mM BICINE	7,90 – 8,71

Tabelle 6: Zur Bestimmung des pH-Optimums der bakteriellen Protease eingesetzte Puffersysteme und -bereiche.

In der zweiten Stufe wurde die Aktivität der erzeugten Prothrombin-Spaltprodukte durch Umsetzung des chromogenen Substrats für Thrombin, gelöst in 50 µl 50 mM Tris-HCl, pH 8,3, 300 mM NaCl gemessen. In Abbildung 31 ist die Steigung der erhaltenen Messkurven in Abhängigkeit vom pH-Wert der ersten Stufe des Aktivitätstests gezeigt.

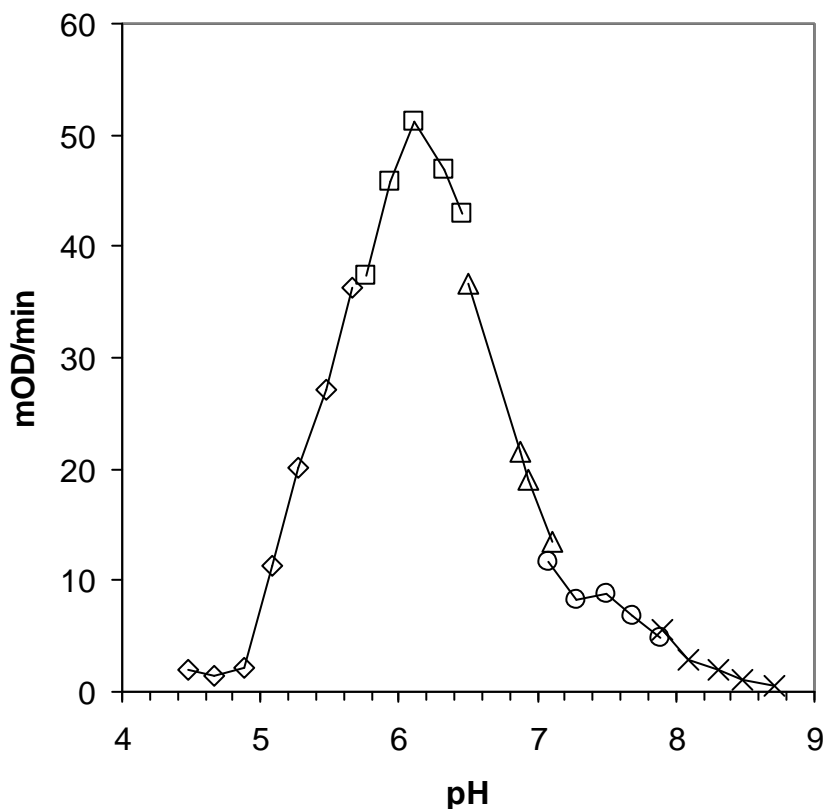


Abbildung 31: Bestimmung des pH-Optimums für die Aktivierung von Prothrombin durch das bakterielle Enzym. Als Puffersysteme dienten Acetat (◇), MES (□), PIPES (Δ), HEPES (○) und BICINE (×) im pH Bereich von 4 – 9.

Der Prothrombin-Aktivator zeigt maximale Aktivität bei pH 6. Die nachfolgenden Untersuchungen wurden deshalb, sofern nicht anders angegeben, im MES-Puffersystem bei pH 6 durchgeführt.

3.3.4 Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität von der Konzentration unterschiedlicher Salze

Aeromonas hydrophila ist ein Süßwasserkeim, der normalerweise in salzarmer Umgebung lebt. Deshalb wäre ein Maximum der enzymatischen Aktivität bei sehr geringen Salzkonzentrationen zu erwarten. Untersuchungen zur Abhängigkeit der Prothrombin-Aktivierung durch das bakterielle Enzym von der Konzentration verschiedener Salze erfolgten mit dem zweistufigen Aktivitätstest (Kap. 2.3.10.2). Im Hinblick auf einen möglichen Einsatz der Protease als diagnostisches Werkzeug in der Analytik von Blut wurde Natriumchlorid, das in humanem Blut in einer Konzentration von 150 mM vorkommt, untersucht. Als Vergleich wurden KCl und LiCl eingesetzt.

Im ersten Schritt erfolgte die Inkubation von 1 μ M Prothrombin in 50 μ l 20 mM MES-Puffer (pH 6) mit dem Prothrombin-Aktivator (10 nM) bei verschiedenen Salzkonzentrationen im Bereich von 0 – 4 M. Anschließend wurde die Prothrombin-aktivierende Aktivität durch EDTA-Zusatz inhibiert, der Reaktionsansatz verdünnt in und mittels einer NAP5-Säule umgepuffert gegen 50 mM Tris-HCl (pH 8,3). In der zweiten Stufe erfolgte die Messung der gebildeten Thrombin-ähnlichen Aktivitäten über den Umsatz des chromogenen Substrates bei pH 8,3 durch Vermischen von 50 μ l Probe mit 50 μ l Substratlösung.

Abbildung 32 zeigt die erhaltenen Kurvensteigungen bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen während der Prothrombin-Aktivierung. Tendenziell ergaben sich gleiche Resultate bei der Untersuchung der Salze NaCl, KCl, und LiCl. Die bakterielle Protease weist hinsichtlich der Aktivierung von Prothrombin maximale Aktivität in Gegenwart von 0 bzw. 1,5 M Salz auf. Bei einer physiologischen Natriumchlorid-Konzentration von 150 mM ist die enzymatische Aktivität vergleichsweise gering. Der genaue Verlauf des in Abbildung 32 gezeigten Aktivitätsprofils ist allerdings von der Vorinkubationszeit im ersten Schritt (Aktivierung von Prothrombin) abhängig. Das

Aktivitätsmaximum bei niedrigen Salzkonzentrationen zeigte sich nämlich erst bei langen Vorinkubationszeiten (15 min).

Die nachfolgenden Untersuchungen der bakteriellen Protease wurden, sofern nicht anders angegeben, in Gegenwart von 0 bzw. 150 mM NaCl durchgeführt.

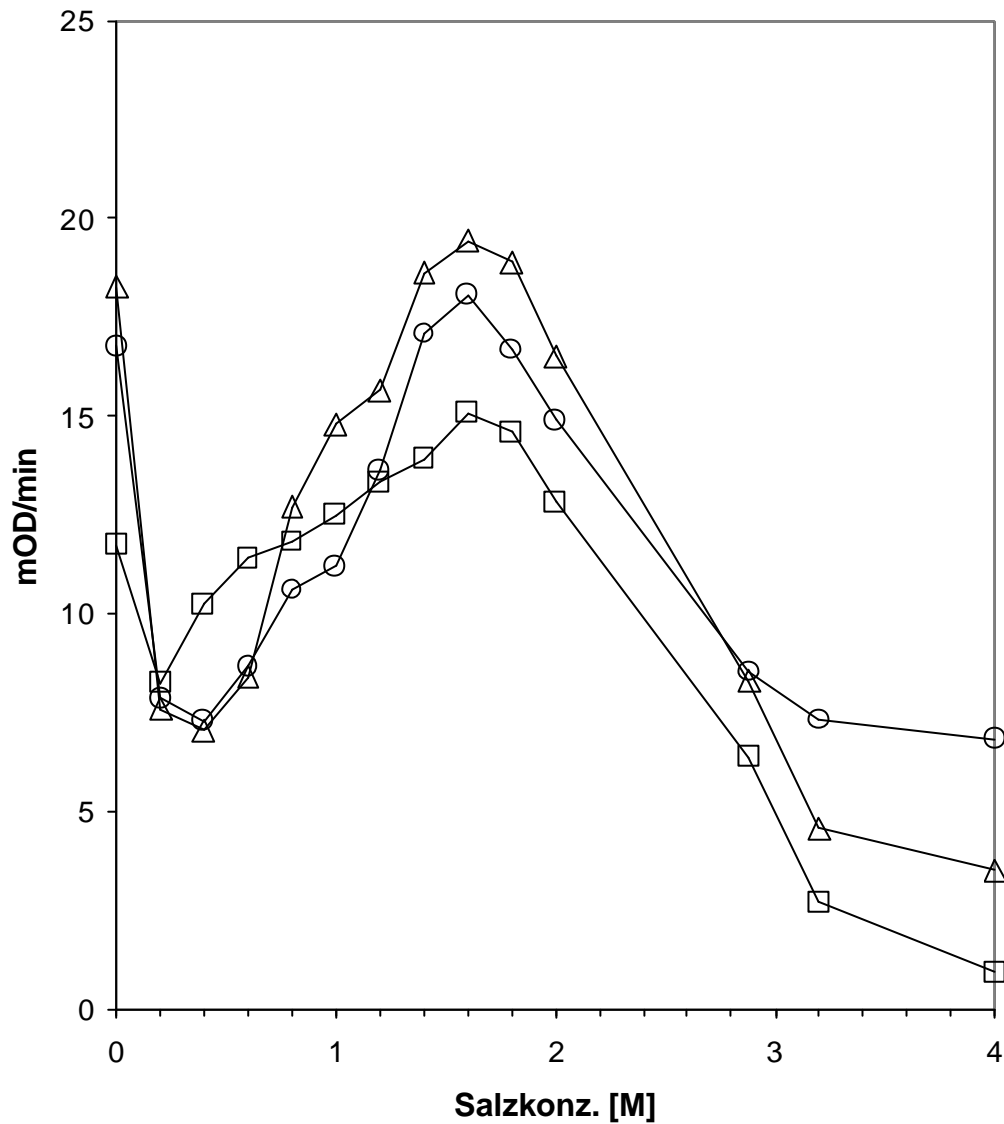


Abbildung 32: Untersuchung der Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität des Prothrombin-Aktivators von der Konzentration verschiedener Salze.

(Δ) NaCl, (◻) LiCl, (○) KCl

3.3.5 Untersuchung der thermischen Stabilität

Zur Untersuchung der thermischen Stabilität des bakteriellen Proteins erfolgte zunächst eine Vorinkubation der Protease für 10 Minuten bei verschiedenen Temperaturen im Bereich zwischen 0 und 90 °C. Anschließend wurde die Probe kurz auf Eis abgekühlt und dann im Rahmen eines zweistufigen Aktivitätstest mit 50 µl einer 1 µM Prothrombin-Lösung 10 min lang inkubiert. Nach EDTA-Zusatz wurde in der zweiten Stufe die Aktivität der generierten Prothrombin-Spaltprodukte durch Zugabe der Substratlösung detektiert. Die gemessene Aktivität in Abhängigkeit von der Temperatur ist in Abbildung 33 wiedergegeben

Das Enzym weist eine hohe Thermostabilität auf. Bis zu einer Temperatur von 55 °C bleibt die Aktivität zu 100% erhalten, bei 60 °C ist die Aktivität noch zu über 50 % vorhanden und erst ab 80°C tritt ein totaler Aktivitätsverlust auf.

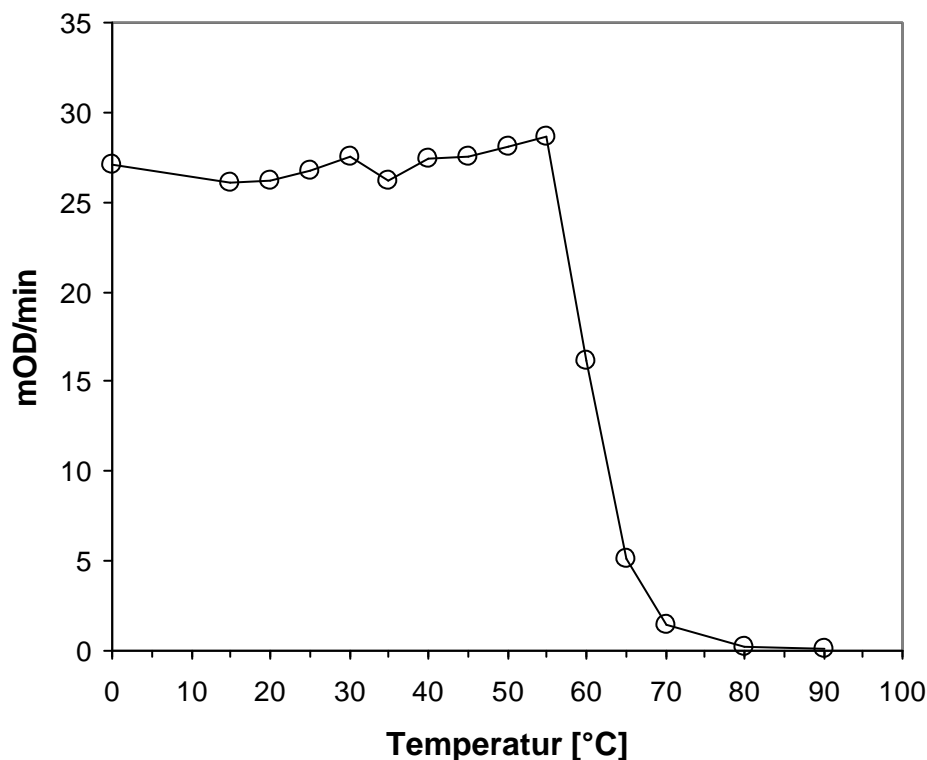


Abbildung 33: Abhängigkeit der Prothrombin-aktivierenden Aktivität von der Temperatur im Bereich zwischen 0 und 90 °C.

Die Prothrombin-aktivierende Aktivität bleibt auch nach tages- und wochenlanger Aufbewahrung bei Raumtemperatur unvermindert erhalten. Routinemäßig wurde das Enzym aber bei 4°C oder –20°C gelagert.

3.3.6 Bestimmung des isoelektrischen Punktes

Die Bestimmung des isoelektrischen Punktes des Prothrombin-Aktivators erfolgte über eine Chromatofokussierung mit einer Mono P-Säule (Kap. 2.3.9). Nach dem Äquilibrieren mit Puffer C (25 mM BIS-TRIS, 5 % w/v Betain, pH 7), wurden 50 µg des bakteriellen Enzyms aufgetragen und die Säule mit Puffer C gewaschen. Der anfangs vorliegende pH-Wert von 7 ermöglichte eine Bindung des Proteins an die positiv geladene Matrix.

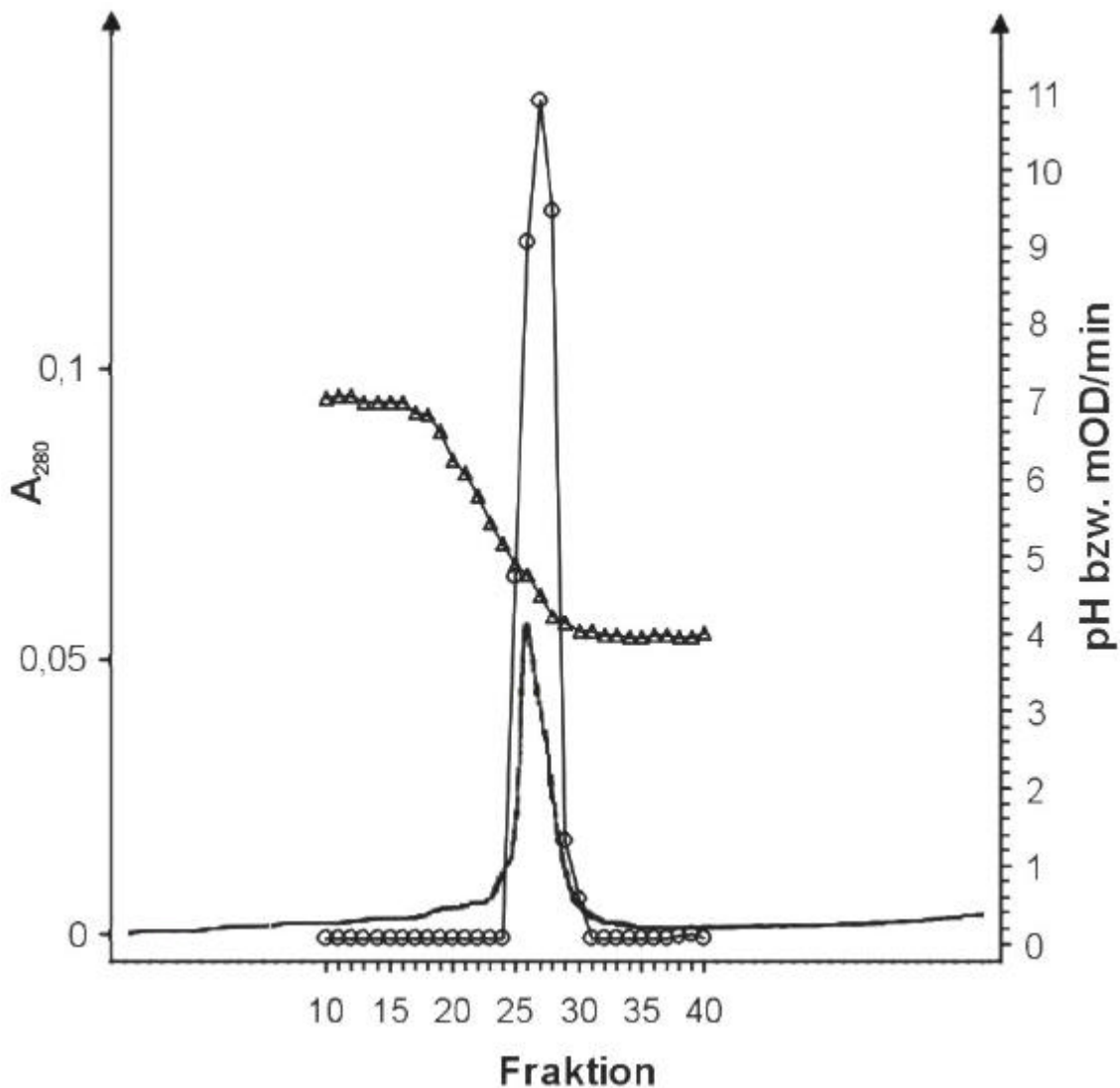


Abbildung 34: Bestimmung des isoelektrischen Punktes des Prothrombin-Aktivators durch Chromatofokussierung. Neben dem Elutionsprofil (—) ist das Aktivitätsprofil (O) und der pH-Gradient (Δ) dargestellt.

Anschließend erfolgte die Elution des Enzyms durch das Anlegen eines pH-Gradienten von 7 bis 4 mit Puffer D (10% w/v Polybuffer 74, 5 % w/v Betain, pH 4) bei niedriger Fließgeschwindigkeit (0,5 ml/min). Der Prothrombin-Aktivator

wurde bei einem pH-Wert eluiert, der seinem isoelektrischen Punkt entspricht, da er aufgrund einer Nettoladung von Null nicht mehr an die Säulenmatrix binden kann. Der pH-Wert in den gesammelten Elutionsfraktionen wurde gemessen und zur Lokalisierung des Prothrombin-Aktivators ein einstufiger Aktivitätstest durchgeführt (Kapitel 2.3.10.1). Die registrierte enzymatische Aktivität und der pH-Wert in den Chromatographiefraktionen sind zusammen mit dem Elutionsprofil in Abbildung 34 dargestellt.

Sowohl im Elutions-, als auch im Aktivitätsprofil zeigt sich ein Peak, welcher von der Lage her übereinstimmt. Anhand des gemessenen pH-Werts in diesem Bereich ergibt sich für den isoelektrischen Punkt des Prothrombin-Aktivators ein Wert von $pI = 4,4$.

3.3.7 Beeinflussung der Prothrombin-aktivierenden Aktivität durch Reaktionszusätze

Um den Einfluss verschiedener Inhibitoren und anderer Modulatoren auf die enzymatische Aktivität des Prothrombin-Aktivators zu untersuchen, und um Hinweise auf die Zugehörigkeit zu einer Enzymfamilie zu erhalten, wurden einstufige Aktivitätstests durchgeführt (Kap. 2.3.10.1).

Je 10 ng (≈ 30 nM Endkonzentration) der bakteriellen Protease wurden für 30 Minuten mit den in Tabelle 7 angegebenen Substanzen und Endkonzentrationen in 50 μ l 20 mM MES-Puffer (pH 6) bei 25°C vorinkubiert. Anschließend erfolgte die Detektion der Prothrombin-aktivierenden Aktivität durch Zusatz von 50 μ l einer Lösung, die Prothrombin und das chromogene Thrombin-Substrat S-2238 enthielt.

Anhand der Steigungen der erhaltenen Messkurven wurden Restaktivitäten, bezogen auf die Aktivität des Enzyms ohne Zusatz eines Modulators bestimmt. Diese sind in Tabelle 7 dargestellt.

Das im Blut in Konzentrationen von 2–5 μ M zirkulierende α_2 -Makroglobulin, welches ein breites Spektrum an Proteasen hemmen kann, inhibiert auch den bakteriellen Prothrombin-Aktivator. Humanes α_2 -Makroglobulin ist ein Tetramer, bestehend aus vier identischen Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von je 180 kDa. Die Polypeptidketten weisen in einem 25 Aminosäurereste langen, zentral gelegenen Ab-

schnitt Spaltstellen für eine Vielzahl Proteasen unterschiedlicher Klassen, die sich bezüglich des katalytischen Mechanismus voneinander unterscheiden, auf. Spaltet ein Enzym in diesem Bereich, so erfolgt im α_2 -Makroglobulin eine Konformationsänderung, die dazu führt, dass die angreifende Protease wie in einem Käfig eingesperrt wird. In diesem Zustand ist die Annäherung an makromolekulare Substratmoleküle (hier Prothrombin) sterisch nicht mehr möglich. Auf diese Weise kann ein Molekül des Inhibitors in Abhängigkeit von der Größe der Proteasen bis zu zwei Enzym-Moleküle umschließen und inaktivieren. In Gegenwart von 1 U/ml dieses Breitband-Inhibitors wies der bakterielle Prothrombin-Aktivator noch eine Restaktivität von 3,9 % auf.

Dahingegen wirkten sich die für die physiologische Gerinnung wichtigen Phospholipide nicht auf die enzymatische Aktivität aus. Ebenso hatten Inhibitoren von Serinproteasen (Pefabloc SC, PMSF, Antithrombin III, α_2 -Antiplasmin), Aspartat-Proteasen (Pepstatin A) und Cystein-Proteasen (NEM, E-64) keinen Einfluss auf die Aktivität der bakteriellen Protease.

Eine vollständige Hemmung der Aktivität war in Gegenwart der Chelatoren o-Phenanthrolin, EDTA und EGTA zu beobachten. Das ist ein Hinweis darauf, dass das bakterielle Enzym zur Familie der Metalloproteasen gehört.

Erfolgte nach einer Vorinkubation mit EDTA die Zugabe bestimmter zweiwertiger Kationen, so trat die enzymatische Aktivität nach dem Übertitrieren des EDTA wieder auf. In Gegenwart einer effektiven Kationenkonzentration im Bereich zwischen 100 – 500 μM nahm die enzymatische Aktivität mit steigender Konzentration an Mn^{2+} , Co^{2+} und Zn^{2+} zu. Im Gegensatz dazu zeigte sich im gleichen Konzentrationsbereich keine Regenerierung der Aktivität durch Ni^{2+} , Mg^{2+} oder das zum Ablauf der physiologischen Gerinnung wichtige Ca^{2+} . Die gemessenen Restaktivitäten in Gegenwart einer effektiven Konzentration von 500 μM der untersuchten Kationen sind in Tabelle 7 gezeigt.

Ohne Vorinkubation mit EDTA zeigte sich keine Beeinflussung der Prothrombin-aktivierenden Aktivität in Gegenwart von 100 – 500 μM der oben genannten Kationen.

Die inhibitorische Eigenschaft von EDTA wurde für zahlreiche Experimente, wie beispielsweise den zweistufigen Aktivitätstests (Kap. 2.3.10.2), eingesetzt. Hier konnte die enzymatische Aktivität nach der ersten Stufe (Prothrombin-Aktivierung) durch

EDTA-Zusatz gezielt ausgeschaltet werden und die nächste Stufe (Messung der erzeugten Thrombin-Aktivität) ohne Beeinflussung (fortschreitende Prothrombin-Aktivierung) durch die bakterielle Protease durchgeführt werden.

		Restaktivität [%]
Enzym alleine		100
α_2 -Makroglobulin	1 U/ml	3,9
α_2 -Antiplasmin	100 μ g/ml	97,7
Antithrombin III	0.5 U/ml	95,6
Phospholipide	10% (v/v)	89,5
Pefabloc SC	2 mM	87,5
PMSF	4 mM	86
Pepstatin A	100 μ M	99
NEM	1 mM	91,6
E64	100 μ M	97
o-Phenanthrolin	1 mM	0,5
EDTA	1 mM	0,3
EGTA	1 mM	0,3
Mg ²⁺	500 μ M*	0,3**
Ni ²⁺	500 μ M*	6,5**
Zn ²⁺	500 μ M*	45,6**
Ca ²⁺	500 μ M*	2,7**
Mn ²⁺	500 μ M*	51,0**
Co ²⁺	500 μ M*	75,6**

*effektive Kationenkonzentration nach dem Übertitrieren des EDTA

**nach Vorinkubation mit 1 mM EDTA

Tabelle 7: Beeinflussung der Aktivität des Prothrombin-Aktivators durch Inhibitoren und andere Modulatoren. Dargestellt sind die eingesetzten Endkonzentrationen dieser Substanzen und die gemessenen Restaktivitäten bezogen auf die enzymatische Aktivität ohne einen Zusatz

3.3.8 Bestimmung kinetischer Parameter der Prothrombin-Aktivierung

Die Ermittlung kinetischer Parameter der Prothrombin-Aktivierung durch das bakterielle Enzym wurde mit Hilfe eines zweistufigen chromogenen Aktivitätstests durchgeführt (Kap. 2.3.11).

Zur Aufnahme der Michaelis-Menten-Kinetik wurden ausgehend von einer Ausgangskonzentration des Substrats Prothrombin von 21,6 μM serielle 1:2 Verdünnungen in 20 mM MES-Puffer (pH 6) erstellt. In der ersten Stufe des Aktivitätstests erfolgte die Vorinkubation des gereinigten Aktivators (10 nM) mit 50 μl Prothrombin-Verdünnung im Konzentrationsbereich 0 – 21,6 μM für 15 min bei 37°C. Entsprechend den ermittelten optimalen Reaktionsbedingungen (Kap. 3.3.4) wurde ein Ansatz in Gegenwart von 1,5 M und ein anderer ohne NaCl durchgeführt, wobei jeweils in Dreifachbestimmung gemessen wurde.

Danach erfolgte der Stopp der Aktivierungsreaktion durch EDTA-Zusatz. In der zweiten Stufe wurden die gebildeten Faktor IIa-ähnlichen Aktivitäten über Spaltung des chromogenen Substrats für 10 Minuten bei 37°C gemessen.

Die Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion wurde zunächst in Form der Steigung (Einheit mOD/min) der aufgenommenen Messkurve erhalten. Mit Hilfe einer Thrombin-Eichgerade, die mit einem humanen Thrombin-Standard (World Health Organisation, WHO) und dem eingesetzten chromogenen Faktor IIa-Substrat erstellt worden war, wurde dann jeweils die gebildete Menge Thrombin (Einheit U/ml) bestimmt.

Bei Auftragung der ermittelten Anfangsreaktionsgeschwindigkeit bzw. der gebildeten Thrombin-Menge gegen die Substratausgangskonzentration ergaben sich sowohl bei dem Ansatz in Gegenwart als auch bei dem ohne Natriumchlorid Michaelis-Menten-Sättigungskurven (Abbildung 35). Die Auswertung erfolgte mit dem Computerprogramm „GraFit“, das durch nicht-lineare Regressionsrechnung die Messwerte an die Michaelis-Menten-Kurve anpasst und daraus die Parameter K_M und v_{\max} berechnet. Die erhaltenen kinetischen Daten sind in Tabelle 8 dargestellt.

In Gegenwart von 0 bzw. 1,5 M NaCl liegt die Michaelis-Menten-Konstante K_M des bakteriellen Enzyms bezüglich der Thrombin-Generierung bei 1,77 μM bzw. 1,47 μM . Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit v_{\max} ist bei einer Natriumchloridkonzentration von 1,5 M doppelt so hoch wie in salzfreiem Milieu.

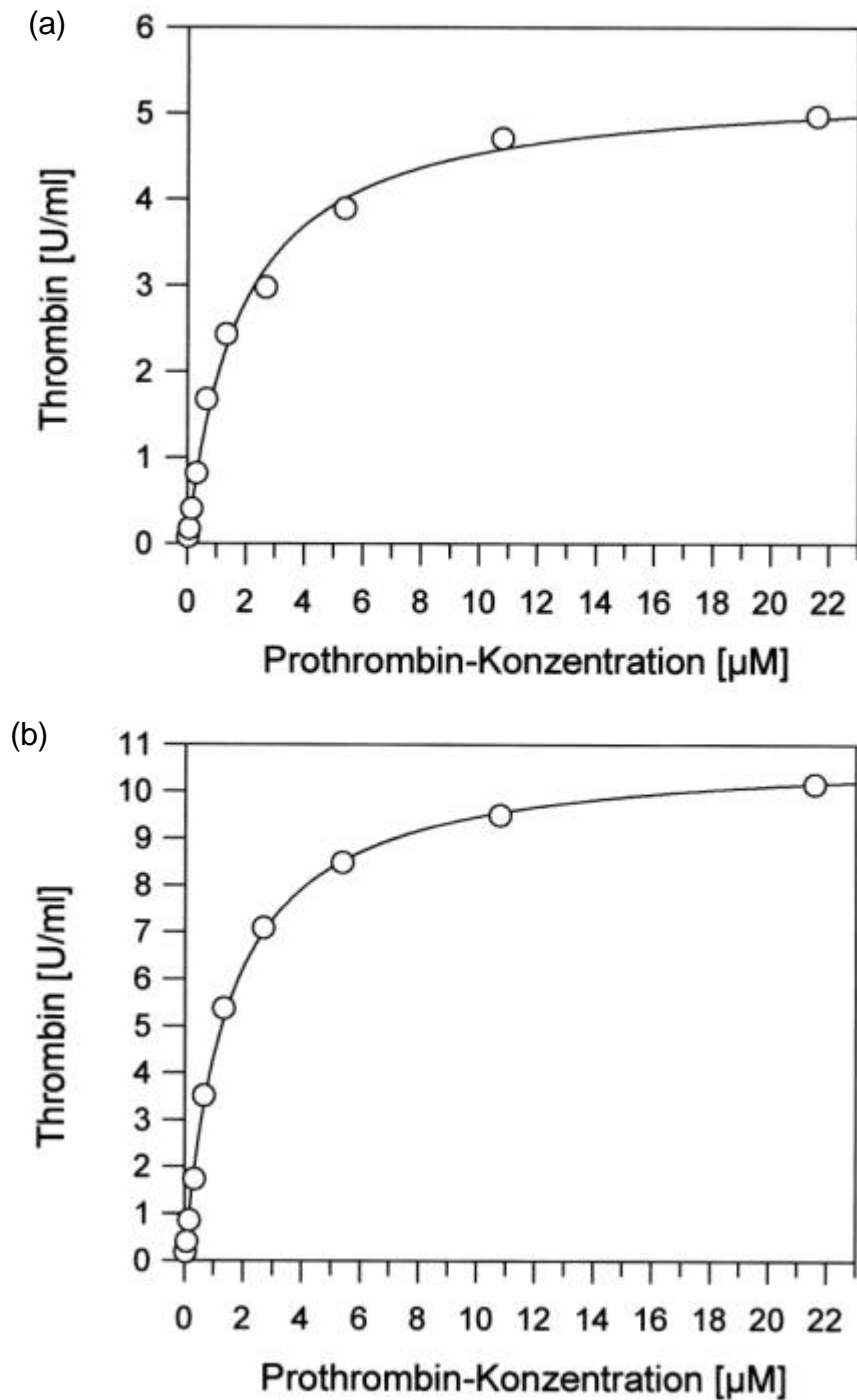


Abbildung 35: Bestimmung kinetischer Parameter (K_M und v_{max}) der Thrombin-Bildung.

Die bakterielle Protease (10 nM) wurde mit Prothrombin (0 – 21,6 μM) 15 min lang inkubiert (Stufe 1). Nach Stopp der Aktivierungsreaktion durch EDTA (1 mM) wurde in der zweiten Stufe die Bildung aktiver Prothrombin-Spaltprodukte durch Umsatz des Substrats S-2238 (1 mM) gemessen. Die generierte Thrombin-Konzentration ist gegen die Ausgangskonzentration des Substrats Prothrombin aufgetragen.

(a) Ansatz mit 0 M NaCl, (b) Ansatz mit 1,5 M NaCl

[NaCl]	K_m	v_{max}
0 M	1,77 μ M	0,81 mol/ (min \times mol Enzym)
1.5 M	1,47 μ M	1,66 mol/ (min \times mol Enzym)

Tabelle 8: Die Michaelis-Menten-Konstante K_m und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit v_{max} des bakteriellen Enzyms bezüglich der Aktivierung von Prothrombin in Abwesenheit bzw. Gegenwart von NaCl

3.4 Quantitative Analyse des Prothrombin-Gehalts in Plasma

Wie in Kapitel 3.3.7 beschrieben, hemmt α_2 -Makroglobulin die Protease aus *Aeromonas hydrophila* rasch und sehr effizient. Nach dem Übertitrieren des α_2 -Makroglobulins durch das bakterielle Enzym lässt sich die Aktivierung von Prothrombin auch in humanem Plasma mit chromogenen und fluorogenen Aktivitätstests nachweisen. Angesichts dessen könnte die Protease aus *Aeromonas hydrophila* eine mögliche Alternative für Schlangengift-Enzyme im Bereich der Gerinnungsanalytik sein.

Um die Eignung der Protease als diagnostisches Werkzeug zu prüfen, wurde ihr Einsatz zur Bestimmung des Prothrombin-Gehalts in Plasma in einem fluorogenen, zweistufigen Aktivitätstest (Kap. 2.3.10.2) untersucht.

Zu diesem Zweck wurde je 1 μ l humanes Faktor II-Mangelplasma (Immuno, Wien) in 50 μ l 20 mM MES-Puffer (pH 6) verdünnt, der geeignete Verdünnungen gereinigten Prothrombins enthielt, um einen Gehalt im Bereich zwischen 0,1 – 200% des Normalwerts, der im Plasma bei 1,4 μ M liegt, einzustellen. Bezogen auf das Gesamtvolumen lag Prothrombin somit in einer Endkonzentration im Bereich zwischen 30 pM (? 0,1%) – 60 nM (? 200%) vor. Nach Zugabe des bakteriellen Enzyms in einer Endkonzentration von 200 nM (4 facher molarer Überschuss bezüglich α_2 -Makroglobulin), wurde 5 min lang bei 25 °C inkubiert und anschließend die Faktor II-Aktivierung durch EDTA-Zusatz (1 mM) beendet. Die Aktivität der gebildeten Prothrombin-Prozessierungsprodukte wurde in der zweiten Stufe durch Zugabe von 50 μ l des fluorogenen Substrats Boc-Val-Pro-Arg-AMC in 50 mM Tris-HCl-Puffer bei pH 8,3 gemessen. Es wurden jeweils Dreifachbestimmungen durchgeführt, um die Streuung der Messwerte innerhalb eines Tests zu untersuchen. Zur Erfassung der Messwert-Schwankungen zwischen verschiedenen Tests und zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, wurden insgesamt drei Aktivitätstests an unter-

schiedlichen Tagen durchgeführt. Die erhaltenen Steigungen der Messkurven in Abhängigkeit von der Prothrombin-Konzentration im Plasma sind in Abbildung 36 gezeigt.

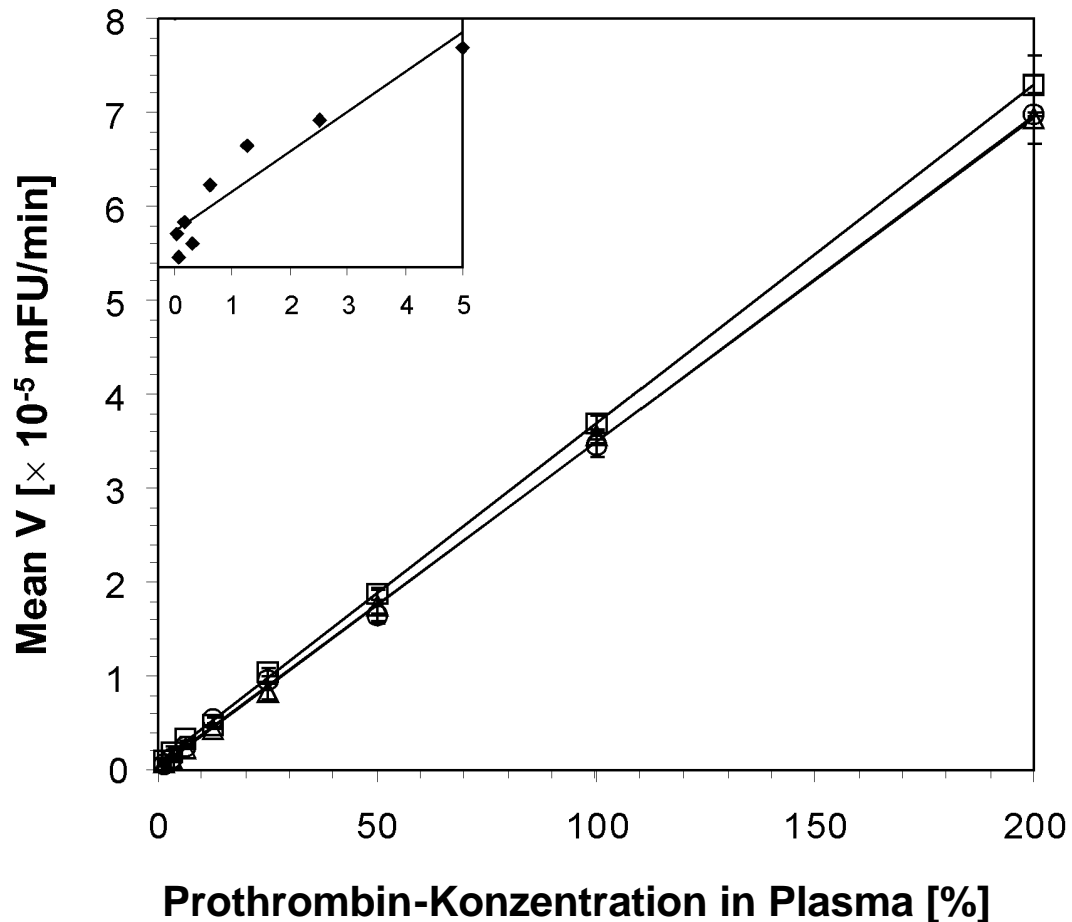


Abbildung 36: Quantifizierung des Prothrombin-Gehalts in humanem Plasma.

Humanes Faktor II-Mangelplasma wurde mit unterschiedlichen Mengen Prothrombin versetzt, um einen Gehalt im Bereich von 0,1 – 200 % des Normalwerts einzustellen. Danach erfolgte eine Inkubation mit der bakteriellen Protease (200 nM) unter Bedingungen, die für die Faktor II-Aktivierung optimalen sind. Anschließend wurde die Thrombin-Bildung durch Zugabe von EDTA gestoppt und die zweite Reaktionsstufe durch Zusatz von Boc-Val-Pro-Arg-AMC eingeleitet. Der Fluoreszenzanstieg wurde photometrisch verfolgt und die Steigung der erhaltenen Kurven in Abhängigkeit von der Prothrombin-Konzentration dargestellt. Es wurden drei Aktivitätstests an unterschiedlichen Tagen jeweils in Dreifachbestimmung durchgeführt, wobei in der Abbildung jeder Test durch eine Ausgleichsgrade repräsentiert wird. Der Ausschnitt im linken oberen Teil der Abbildung zeigt das Fluoreszenz-Signal im Prothrombin-Konzentrationsbereich zwischen 0 und 5 % des Normalwerts.

Über einen weiten Prothrombin-Konzentrationsbereich zwischen 3-200 % des Normalwerts ergab sich eine sehr gute Korrelation zwischen der Signalstärke und dem Faktor II – Gehalt. Die Standardabweichung der Messwerte innerhalb eines Tests lag hier zwischen 2-7%. Eine deutliche Streuung der Messwerte und höhere Standardabweichungen (bis zu 30 %) zeigten sich erst im Konzentrationsbereich unterhalb von 3 %.

Darüber hinaus wurde eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse bei verschiedenen Tests festgestellt. Die Standardabweichung der an unterschiedlichen Tagen gemessenen Werte lagen bei 2-8 % (15-25 %) im Prothrombin-Konzentrationsbereich zwischen 3-200% (unterhalb von 3 %) des Normalwerts .

Als Vergleich wurde humanes Normalplasma in Dreifachbestimmung unter gleichen Bedingungen untersucht. Anhand des ermittelten Fluoreszenzsignals und der in Abbildung 36 gezeigten "Eichkurven", ergab sich ein Prothrombin-Gehalt von ca. 97 % des Normalwerts.

Das Enzym erscheint somit als sehr geeignet zur Quantifizierung des Prothrombin-Gehalts in Plasma und zum Einsatz als diagnostisches Werkzeug.

4. Diskussion

4.1 Die Rolle des Prothrombin-Aktivators aus *Aeromonas hydrophila* als potentieller Pathogenitätsfaktor

Aeromonas hydrophila ist ein gram-negativer Wasserkeim, der als Erreger von Fischinfektionen bekannt ist (Austin & Austin, 1993; Del Corral et al., 1990; Paniagua et al., 1990). Er löst eine hämorrhagische Sepsis aus, die zum Tod der Fische führt. Für Fischzuchten stellt *Aeromonas hydrophila* somit eine ernste Bedrohung dar. Untersuchungen zeigten, dass die von diesem Organismus produzierte Elastase, neben anderen sekretierten Proteasen und Toxinen (Janda, 1985; Joanne et al., 1989) wie beispielsweise Aerolysin (β -Hemolysin) (Letellier et al., 1997), einen Pathogenitätsfaktor darstellt. Bakterienmutanten mit einem inaktivierten Elastase-Gen bedingen, im Vergleich zu denen mit intaktem Gen, einen um den Faktor 100 höheren LD₅₀-Wert bei Forellen (Cascon et al., 2000).

Aeromonas hydrophila ist fakultativ humanpathogen und verursacht bei Menschen Wundinfektionen und Durchfallerscheinungen (Altwegg & Geiss, 1989; Holmberg et al., 1986). Für eine gesunde Person stellt dieser Organismus im Normalfall keine ernsthafte Bedrohung dar. Bei immungeschwächten Patienten hingegen kann das Bakterium teils schwere Infektionen auslösen, die in einigen Fällen tödlich endeten (Hill et al., 1954; Scott et al., 1978; Picard et al., 1984).

Der Wasserkeim synthetisiert eine Reihe extrazellulärer Proteine, die bei Menschen toxische Wirkungen haben. Eine Rolle des Prothrombin-Aktivators als potentieller Pathogenitätsfaktor, ähnlich wie die Elastase bei Fischen, ist nach jetzigem Kenntnisstand nicht auszuschließen. Neben der Aktivierung von Prothrombin katalysiert er die Spaltung anderer Plasmaproteine, wie beispielsweise der Gerinnungsfaktoren IX, X, XI und XIII. Ob diese Prozessierung mit einer Aktivierung einhergeht, muss im Einzelnen noch analysiert werden. Bei Antithrombin III beispielsweise führt die durch das bakterielle Enzym katalysierte Spaltung zur Inaktivierung dieses Inhibitors der Gerinnung. Potentiell hat der Prothrombin-Aktivator somit eine prokoagulatorische Wirkung.

Auch nach dem Übertitrieren des Inhibitors α_2 -Makroglobulin wird in humanem Plasma keine Gerinnung durch den Prothrombin-Aktivator ausgelöst. Eine Erklärung dafür kann der Abbau des Fibrinogens durch die bakterielle Protease unter Freisetzung von Spaltprodukten, die zu keiner Polymerisation fähig sind, sein. Dies und die Tatsache, dass Fibrin gespalten wird, deutet auf einen potentiell antikoagulatorischen Charakter der bakteriellen Protease hin.

Vermutlich wirkt sich das bakterielle Enzym durch die Spaltung zahlreicher Gerinnungsfaktoren und anderer Plasmaproteine auf den Prozess der Blutgerinnung entscheidend aus, so dass eine prinzipielle Bedrohung für den Menschen vorstellbar ist.

Obwohl im Rahmen der vorliegenden Arbeit vorwiegend die Spaltung humaner Komponenten der Gerinnungskaskade untersucht wurde, lässt sich vermuten, dass eine ähnliche Auswirkung der bakteriellen Protease auch auf Gerinnungsfaktoren anderer Organismen zu beobachten ist. Das wäre eine Erklärung für die bei Fischen zu beobachtende Auslösung einer hämorrhagischen Sepsis im Falle einer Infektion mit *Aeromonas hydrophila*.

Allerdings sprechen die folgenden Beobachtungen dafür, dass diese Protease für gesunde Menschen im Normalfall wahrscheinlich keine ernsthafte Bedrohung darstellt.

Das Enzym weist maximale Aktivität bei unphysiologischen NaCl-Konzentrationen von 0 bzw. 1,5 M auf. Für einen Süßwasserkeim, der normalerweise in salzarmen Milieu lebt, ist das Aktivitätsmaximum der Protease in Abwesenheit von Salz sinnvoll. Bei der im menschlichen Blut vorliegenden Kochsalzkonzentration von 150 mM ist die enzymatische Aktivität hingegen vergleichsweise schwach ausgeprägt.

Das pH-Optimum der bakteriellen Protease bezüglich der Aktivierung von Prothrombin liegt bei pH 6. Bei dem physiologischen pH-Wert von 7,4 im menschlichen Blut ist das Enzym wesentlich weniger aktiv.

Der im Blut in einer Konzentration von 2–5 μ M zirkulierende Breitband-Inhibitor α_2 -Makroglobulin schaltet die Prothrombin-aktivierende Aktivität sehr effizient aus und müsste übertitriert werden, damit das bakterielle Enzym seine Aktivität entfalten kann. Um das zu erreichen, wäre eine verhältnismäßig hohe Enzymkonzentration bzw. Bakteriendichte im Blut nötig, was im Normalfalle bei einem gesunden Menschen durch die Immunabwehr verhindert wird.

Bei immungeschwächten Patienten könnten die Rahmenbedingungen möglicherweise anders sein. Eine prinzipielle Bedrohung und eine potentielle Rolle des Enzyms als Pathogenitätsfaktor kann in diesem Falle somit nicht völlig ausgeschlossen werden.

Andere Beispiele für humanpathogene Bakterien sind *Staphylococcus aureus* (Rogolsky, 1979; Fussle et al., 1981) und *Pseudomonas aeruginosa* (Woods & Iglewski, 1983; Cross et al., 1980), die eine Reihe gefährlicher Toxine sekretieren können. Für gesunde Menschen sind diese Organismen normalerweise keine lebensbedrohende Gefahr. Dahingegen lösen sie bei immungeschwächten Personen häufig schwere Infektionen aus, die tödlich verlaufen können. Bei einer Infektion mit *Staphylococcus aureus* sind oft thromboembolische Komplikationen und andere schwere Gerinnungsstörungen zu beobachten. Ein bekannter Pathogenitätsfaktor von *Staphylococcus aureus* ist ein Prothrombin-Aktivator namens Staphylocoagulase (Hendrix et al., 1983; Kawabata et al., 1985). Ähnlich wie die aus *Peptococcus indolicus* stammende Peptocoagulase (Switalski et al., 1978) bewirkt sie die Aktivierung von Prothrombin durch Bildung eines äquimolaren Komplexes. Durch damit einhergehende Konformationsänderungen erfolgt dann die Exposition des aktiven Zentrums von Faktor II. Das ermöglicht die Prozessierung des Fibrinogens zu Fibrin durch den binären Komplex unter Freisetzung der Fibrinopeptide. Die Aktivierung von Prothrombin erfolgt hier also nicht über die Spaltung von Peptidbindungen und Bildung von α -Thrombin. Staphylocoagulase und Peptocoagulase sind keine Enzyme und unterscheiden sich vom Wirkungsmechanismus her grundsätzlich von dem Prothrombin-Aktivator aus *Aeromonas hydrophila*.

Eine größere Ähnlichkeit besteht zwischen der *Aeromonas hydrophila*-Protease und einem anderen Pathogenitätsfaktor, der von *Staphylococcus aureus* gebildet wird. Hierbei handelt es sich ebenfalls um eine Metalloprotease, die Zn^{2+} -Ionen als Kofaktoren verwendet, und die Prothrombin aktivieren kann (Drapeau, 1978). Nach einer Vorinkubation mit EDTA kann die enzymatische Aktivität bei beiden Proteasen durch Zugabe von Zn^{2+} oder Co^{2+} regeneriert werden, wobei Co^{2+} jeweils stärker stimulierend wirkt.

Pseudomonas aeruginosa bildet ebenfalls eine Metalloprotease, die Prothrombin aktiviert und den oben beschriebenen Enzymen ähnelt (Pulverer et al., 1980).

Zum einen konnte bei einer Durchmusterung verschiedener Bakterien im Rahmen der vorliegenden Arbeit das Vorhandensein eines Prothrombin-Aktivators im Überstand einer *Pseudomonas aeruginosa*-Kultur bestätigt werden (Kap. 3.1). Zum anderen weist der Prothrombin-Aktivator aus *Aeromonas hydrophila* eine Sequenzhomologie von annähernd 55 % mit einer Metalloprotease aus *Pseudomonas aeruginosa* auf, die Elastase-ähnliche Aktivität zeigt (Fukushima et al., 1989). Ob es sich hierbei um den von Pulverer et al. (1980) beschriebenen Prothrombin-Aktivator handelt, ist noch unklar.

Der Prothrombin-Aktivator aus *Aeromonas hydrophila* weist sowohl auf DNA- als auch auf der Aminosäureebene eine Sequenzidentität von 90% mit einem als Elastase bezeichnetem Enzym aus dem gleichen Organismus und der so genannten Pro-Aminopeptidase Processing Protease aus *Aeromonas caviae* auf (Nirasawa et al., 1999; Cascon et al., 2000). Diese drei Proteine werden zunächst als Präproproteine mit einer Länge von je ca. 590 Aminosäureresten gebildet, die aus vier Domänen (Signalsequenz, N- und C-terminale Propeptide, reife Region) bestehen (Abbildung 37). Bei den nach Entfernung der Signalsequenz und der autokatalytischen Abspaltung der Propeptide erhaltenen, reifen Enzymen handelt es sich um thermostabile Metalloproteasen, die als gemeinsames Strukturmerkmal ein Zinkfinger-Motiv enthalten. Dieses beinhaltet das aktive Zentrum (Nirasawa et al., 1999; Cummins et al., 1999). Die durch SDS-PAGE ermittelten Werte der Molekulargewichte der reifen Pro-Aminopeptidase-Processing Protease (30 kDa), der Elastase (38 kDa) und des Prothrombin-Aktivators (35 kDa) stimmen gut miteinander überein. Anhand der vorliegenden Daten, lässt sich vermuten, dass es sich bei den drei Enzymen um Varianten eines Proteins aus unterschiedlichen Organismen handeln könnte. Die geringfügigen Sequenzunterschiede resultieren vermutlich aus genetischen Unterschieden eng verwandter Bakterienstämme.



Abbildung 37: Schematischer Aufbau des Prothrombin-Aktivators und der Elastase aus *Aeromonas hydrophila* und der Pro-Aminopeptidase-Processing Protease aus *Aeromonas caviae*. Am Aminotermius befindet sich eine Signalsequenz, gefolgt von einem Propeptid und der reifen Region. Ein weiteres Propeptid liegt am C-Terminus der Proteine vor. Die Abspaltung der Propeptide erfolgt autokatalytisch.

Darüber hinaus ergibt sich eine Sequenzhomologie von 52-55 % mit Metalloproteasen aus *Vibrio proteolyticus*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio anguillarum* und *Vibrio vulnificus*, die Zn^{2+} -Fingermotive und teils Elastase-ähnliche Aktivität aufweisen (David et al., 1992; Hase & Finkelstein, 1991; Milton et al., 1992; Cheng et al., 1996). Hierbei sind Sequenzbereiche mit hoher und solche mit geringer Homologie zu unterscheiden. Zu Abschnitten mit einer hohen Homologie auf DNA- bzw. Aminosäureebene in den Sequenzen des Prothrombin-Aktivators, der Elastase, der Pro-Aminopeptidase Processing Protease und der oben erwähnten Metalloproteasen zählt beispielsweise das Zinkfinger-Motiv und das darin enthaltene aktive Zentrum (Nirasawa et al., 1999). Beachtenswert ist außerdem die Konservierung der Positionen der Cystein-Reste, die eine wichtige Rolle für die Aufrechterhaltung der nativen Raumstruktur der reifen Enzyme und/oder für die Katalyse spielen könnten, in allen Sequenzen.

Die hohe Sequenzhomologie bzw. die große Ähnlichkeit der Eigenschaften mit Proteinen bzw. Pathogenitätsfaktoren aus humanpathogenen Erregern wie beispielsweise *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Vibrio cholerae*, ist ein weiteres Indiz dafür, dass der Prothrombin-Aktivator aus *Aeromonas hydrophila* eine potentielle Bedrohung für den Menschen darstellen kann.

4.2 Einsatz in der biomedizinischen Analytik als Alternative zu Schlangengift-Proteasen

Die enzymatische Aktivität des Prothrombin-Aktivators aus *Aeromonas hydrophila* kann durch Chelat-Bildner wie beispielsweise o-Phenanthrolin, EDTA und EGTA völlig ausgeschaltet werden. Das ist ein Hinweis darauf, dass das Enzym zur Klasse der Metalloprotease gehört. Durch anschließenden Zusatz bestimmter zweiwertiger Kationen wie beispielsweise Mn^{2+} , Co^{2+} oder Zn^{2+} lässt sich die Aktivität teilweise regenerieren. Ähnlich wie im Falle der von Fukushima et al. (1989) beschriebenen Zink-Metalloprotease stimuliert hierbei Co^{2+} stärker als Zn^{2+} . Hingegen zeigte sich keine Reaktivierung durch Zugabe der für den Ablauf der physiologischen Gerinnung wichtigen Ca^{2+} -Ionen.

Mehrere Gründe können dafür verantwortlich sein, dass keine vollständige Wiederherstellung der enzymatischen Aktivität nach Zugabe der zweiwertigen Kationen zu beobachten war. Eventuell handelte es sich bei den zugesetzten Ionen nicht um den physiologischen Kofaktor oder die gewählte Konzentration war nicht optimal. Mögli-

cherweise denaturiert die Protease auch teilweise irreversibel nach Entfernen des stabilisierenden Kations durch EDTA. Die möglicherweise erfolgende Denaturierung sollte sich durch Zirkulardichroismus(CD)-Spektroskopie näher untersuchen lassen.

Genauere Untersuchungen sind noch erforderlich, um zu klären, ob es sich bei Zn^{2+} um den physiologischen Kofaktor handelt. Ein Hinweis darauf könnte die partielle Reaktivierung der enzymatischen Aktivität des Prothrombin-Aktivators nach Vorinkubation mit EDTA durch Zn^{2+} sein. Ferner zeigt das Enzym aus *Aeromonas hydrophila* eine hohe Sequenzhomologie von über 50 Prozent mit Zink-Metalloproteasen aus *Vibrio proteolyticus*, *Vibrio vulnificus* und *Pseudomonas aeruginosa* (David et al., 1992; Cheng et al., 1996; Fukushima et al., 1989). Besonders erwähnenswert ist in diesem Zusammenhang, dass der Prothrombin-Aktivator (ebenso wie die homologen Enzyme) in der Primärstruktur die Sequenz HEXXH (H = Histidin, E = Glutamat, X = beliebige Aminosäure) aufweist, die Teil eines konservierten Zinkfinger-Motivs im aktiven Zentrum von Zink-Metalloproteasen ist (Cummins et al., 1999).

Im Verlauf der Untersuchungen zeigte das bakterielle Enzym verschiedene Gemeinsamkeiten mit oder sogar Vorteile gegenüber Prothrombin-Aktivatoren aus Schlangengiften.

Verglichen mit Schlangengift-Enzymen, weist die Protease aus *Aeromonas hydrophila* die höchste Ähnlichkeit mit Prothrombin-Aktivatoren der Klasse 1 auf. Gemeinsam ist ihnen ihr Charakter als Metalloprotease, deren Prothrombin-aktivierende Aktivität unabhängig ist von Faktor Va, Ca^{2+} -Ionen und Phospholipiden. Ein prominenter Vertreter der Klasse 1 Prothrombin-Aktivatoren ist das Ecarin aus dem *Echis carinatus* venom. Ähnlich wie im Falle der Aktivierung durch Ecarin, führt die Spaltung des Prothrombins durch das bakterielle Enzym zur Bildung von authentischem α -Thrombin (neben anderen Spaltprodukten). Analog zu dem Schlangengift-Enzym (und zu Faktor Xa) spaltet die *Aeromonas hydrophila*-Protease humanen Faktor II zwischen der Peptidbindung Arg₃₂₀-Ile₃₂₁, der Grenze zwischen A- und B-Kette des Thrombins.

Zur Bestimmung des Prothrombin-Gehalts in Plasma werden gegenwärtig verschiedene Schlangengift-Enzyme (z.B. Ecarin) in der biomedizinischen Analytik eingesetzt, deren kinetische Parameter sie auf den ersten Blick attraktiver erscheinen lassen. Ecarin beispielsweise ist charakterisiert durch eine Michaelis-Menten-Konstante von $K_m = 0,44 \mu\text{M}$ und eine maximale Reaktionsgeschwindigkeit $v_{\text{max}} = 17 \text{ mol/ (min} \times$

mol Ecarin) (Yamada et al., 1996). Bezogen auf die Aktivierung von Prothrombin weist das bakterielle Enzym in Gegenwart von 1,5 M NaCl eine Michaelis-Menten-Konstante ($K_m = 1,47 \mu\text{M}$) auf, die dreimal so hoch ist wie die des Ecarins. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit ($v_{\max} = 1,66 \text{ mol/ (min} \times \text{mol Enzym)}$) der Protease aus *Aeromonas hydrophila* ist hingegen um den Faktor 10 geringer als die des Schlangengift-Enzyms. Das erscheint verständlich im Hinblick darauf, dass die physiologische Hauptaufgabe des bakteriellen Enzyms wohl nicht in der Aktivierung von Prothrombin besteht. Wahrscheinlich handelt es sich hierbei vielmehr um eine zufällige Aktivität.

Anhand von Western Blot-Analysen (Kap 3.6.2) zeigte sich, dass im Verlauf der Prothrombin-Aktivierung eine Vielzahl von Spaltprodukten entstehen, die mit dem eigentlichen Substrat Prothrombin um das aktive Zentrum der bakteriellen Protease konkurrieren. Die ermittelten Werte K_m und v_{\max} der *Aeromonas hydrophila*-Protease für die Thrombin-Generierung sind deshalb vermutlich ungenau. Wäre eine Messung in Abwesenheit dieser konkurrierenden Spaltprodukte möglich, würde man wahrscheinlich einen höheren Wert für v_{\max} erhalten, der vielleicht mit dem des Ecarins vergleichbar wäre. In diesem Falle würde Ecarin bezüglich der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit im Vergleich zur *Aeromonas hydrophila*-Protease nicht attraktiver erscheinen.

Schlangengift-Enzyme weisen zwar offenbar eine höhere Reaktionsgeschwindigkeit auf, sind aber eventuell teurer. Gewonnen werden sie in den meisten Fällen durch Melken der Schlangen und Isolierung aus den erhaltenen Giften. Eine interessante Alternative dazu wäre der bakterielle Prothrombin-Aktivator, der vergleichsweise vermutlich billiger, in größeren Mengen und mit geringerem Aufwand produziert und aus dem Medium einer *Aeromonas hydrophila*-Kultur nach einem einfachen Reinigungsschema isoliert werden kann. Die Ausbeute ließe sich eventuell durch eine rekombinante Herstellung der Protease noch steigern. Nirasawa et al. (1999) beschrieben die erfolgreiche Überexpression des homologen Präproproteins Pro-aminopeptidase Processing Protease aus *Aeromonas caviae* in *E. coli*. Prinzipiell sollte das Verfahren auch auf das Enzym aus *Aeromonas hydrophila* anwendbar sein. Da der bakterielle Prothrombin-Aktivator eventuell preiswerter und in höheren Mengen hergestellt werden kann, ließe sich die im Vergleich zu Ecarin geringere Reaktionsgeschwindigkeit durch den Einsatz größerer Mengen für einen Test kompensieren. Von Vorteil ist ferner die hohe Thermostabilität des *Aeromonas hydrophi-*

Ia-Enzyms, die eine Reinigung unter einfachen Bedingungen bei Raumtemperatur und eine lange Lagerung ohne nennenswerten Aktivitätsverlust (selbst bei Raumtemperatur) ermöglicht.

Ein weiterer Vorteil der Gewinnung eines bakteriellen Enzyms besteht in der Vermeidung des direkten Umgangs mit gefährlichen Schlangen.

Die Beobachtung, dass das bakterielle Enzym zwar Prothrombin zu authentischem Thrombin prozessieren, aber die Gerinnung in Plasma nicht auslösen konnte, war unerwartet. Eine Erklärung dafür lieferten weitere Untersuchungen, die zeigten, dass α_2 -Makroglobulin das bakterielle Enzym sehr effizient hemmt. Darüber hinaus spaltet die *Aeromonas hydrophila*-Protease Fibrinogen unter Freisetzung von Fragmenten, die zu einer Polymerisation nicht in der Lage sind.

Die Eigenschaft der Protease einerseits durch α_2 -Makroglobulin inaktiviert zu werden und andererseits Prothrombin zu Thrombin zu aktivieren, lassen das Enzym als geeignetes diagnostisches Werkzeug erscheinen. Beispielsweise wäre ein Einsatz der bakteriellen Protease für die Analytik des α_2 -Makroglobulins denkbar. Zu diesem Zweck könnte die zu analysierende Probe des Breitband-Inhibitors mit einer Verdünnungsreihe bekannter Konzentrationen der *Aeromonas hydrophila*-Protease inkubiert werden. Anschließend könnten diese Ansätze mit Prothrombin inkubiert werden und die Generierung von Thrombin über Umsetzung eines fluorogenen oder chromogenen Substrats verfolgt werden. Da ein Signal erst detektiert werden kann wenn der Inhibitor im molaren Verhältnis 2:1 übertitriert wurde, läßt sich anhand der bekannten Konzentrationen der bakteriellen Protease dann der Gehalt des funktionell aktiven α_2 -Makroglobulins in der Probe ermitteln.

Nach dem Übertitrieren des α_2 -Makroglobulins mit der bakteriellen Protease eignet sich das Enzym zur chromogenen oder fluorogenen Bestimmung des Prothrombin-Gehalts in Plasma. Der in dieser Arbeit etablierte zweistufige fluorogene Aktivitätstest hat den Vorteil einer wesentlich höheren Sensitivität gegenüber herkömmlichen Messungen der Rekalzifizierungszeit bzw. chromogenen Aktivitätstests, die in der Gerinnungsanalytik routinemäßig eingesetzt werden. Bereits 1 μ l Plasma ist als Probenmenge ausreichend, um den Prothrombin-Gehalt in Plasma mit hoher Genauigkeit zu bestimmen. Ein weiterer Vorteil dieses Testsystems ist, dass die Messung durchgeführt werden kann, ohne die Gerinnung auszulösen, was durch damit verbundene Lichtstreuungseffekte bei photometrischen Analysen die Messungen beeinflussen

würde. Das ist zum einen darauf zurückzuführen, dass das Plasma (und das darin enthaltene Fibrinogen) im Verlauf des Tests um den Faktor 100 verdünnt wird. Bei so niedrigen Fibrinogen-Konzentrationen ist die Bildung eines Fibrinnetzwerks nicht möglich. Zum anderen spaltet die bakterielle Protease Fibrinogen zu Fragmenten, die nicht in der Lage sind zu polymerisieren.

Untersuchungen zur quantitativen Analyse des Prothrombin-Gehaltes in humanem Normalplasma mit Hilfe der *Aeromonas hydrophila*-Protease zeigten eine gute Korrelation der Signalstärke mit der Prothrombin-Konzentration im Bereich zwischen 3 – 200 % des Normalwerts (Kap. 3.4). Nennenswerte Schwankungen der Messwerte innerhalb einer Dreifachbestimmung traten nicht auf. Zudem zeigte sich auch eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse beim Vergleich der Werte verschiedener Dreifachbestimmungen, die an unterschiedlichen Tagen durchgeführt wurden.

Lediglich im Bereich unterhalb von 3 % ergaben sich Schwankungen der Messwerte und Abweichungen von der sehr guten Korrelation, die teils vermutlich auf geringe Restmengen Prothrombin im eingesetzten Faktor II-Mangelplasma zurückzuführen sind. In diesem Bereich lag die Konzentration des eingesetzten Substrats Prothrombin zwischen 30 pM – 900 pM und ebenso hoch wäre die maximal zu erwartende Konzentration des gebildeten Thrombins. Angesichts dessen erscheint das Fehlen einer linearen Korrelation zwischen der Signalstärke und dem Prothrombingehalt verständlich, da vermutlich die Nachweisgrenze des Testsystems unterschritten wurde. Für die praktische Anwendung des Enzyms im Bereich der klinischen Diagnostik ist das allerdings nicht relevant, da Menschen mit einem so geringen Prothrombin-Spiegel nicht lebensfähig sind.

Die Beobachtung, dass die Aktivität der bakteriellen Protease nach Inaktivierung durch EDTA mit Zink-, Mangan- oder Kobaltsalzen reaktiviert werden kann, ermöglicht ein einfaches Aus- bzw. Einschalten der enzymatischen Aktivität durch Zugabe des Chelators bzw. der entsprechenden Salze. Keine Reaktivierung des Enzyms ist hingegen durch Zugabe von Ca^{2+} -Ionen möglich. Bei dem beschriebenen zweistufigen fluorogenen Aktivitätstest (Kap. 2.3.10.2) lässt sich die Aktivierung des Prothrombins von der Messung des erzeugten Thrombins entkoppeln durch Komplexierung des für die erste Stufe erforderlichen Kations mit EDTA. Die zweite Stufe kann somit ohne Beeinflussung (fortschreitende Prothrombin-Aktivierung) durch das *Aeromonas hydrophila*-Enzym durchgeführt werden. Die bakterielle Protease stört darüber hinaus auch nicht die Detektion des gebildeten Thrombins durch chromoge-

ne oder fluorogene Substrate, da diese durch das *Aeromonas hydrophila*-Enzym nicht gespalten werden. Die Unabhängigkeit der bakteriellen Protease von Ca^{2+} -Ionen ermöglicht quantitative Analysen der Prothrombinkonzentration in komplexen Systemen wie Citrat-haltigem humanem Normalplasma in dem fluorogenen Test ohne störenden Einfluß der physiologischen Gerinnung. Die Prothrombin-Aktivierung durch das *Aeromonas hydrophila*-Enzym kann in Abwesenheit von Ca^{2+} -Ionen durchgeführt werden, was den Ablauf der physiologischen Gerinnung und somit ein störendes Hintergrundsignal durch die Aktivierung des Prothrombins durch Faktor Xa verhindert. Da das Plasma im fluorogenen Test im Verhältnis 1:100 verdünnt wird, liegt der darin enthaltene Chelator Citrat in so geringer Konzentration vor, dass die bakterielle Metalloprotease nicht inhibiert wird.

Das Enzym aus *Aeromonas hydrophila* stellt somit ein geeignetes diagnostisches Werkzeug dar, mit dem beispielsweise der Prothrombin-Gehalt in Plasma über einen weiten Bereich gut und reproduzierbar analysiert werden kann.

4.3 Ausblick

Im Rahmen dieser Doktorarbeit erfolgte die biochemische Charakterisierung des reifen Prothrombin-Aktivators aus *Aeromonas hydrophila*. Seine Genstruktur weist allerdings darauf hin, dass er zunächst als Präproprotein mit einer Länge von 591 Aminosäureresten gebildet wird, die wahrscheinlich in 4 Domänen organisiert sind. Neben der Signalsequenz umfasst es N bzw. C-terminale Propeptide, die vermutlich autokatalytisch entfernt werden, und eine reife Region. Der durch Edman-Abbau ermittelte N-Terminus des aktiven Enzyms beginnt bei Lys₁₈₄. Eine genaue Analyse des Aktivierungsvorgangs des Prothrombin-Aktivators aus *Aeromonas hydrophila* ausgehend von der inaktiven Präproprotein-Form wäre ein Ansatzpunkt zur weiterführenden Charakterisierung.

Die Aktivierung des Prothrombin-Aktivators erfolgt vermutlich analog zu der des Elastase-Vorläufers aus *Aeromonas hydrophila* (Cascon et al., 2000). Im Falle der Elastase wurden bereits Untersuchungen zur Aktivierung des Zymogens angestellt. Zu diesem Zweck wurden einer *Aeromonas hydrophila*-Kultur in der spätlogarithmischen Wachstumsphase zu unterschiedlichen Zeiten Proben entnommen und für Western-Blot-Analysen mit polyklonalen Antikörpern gegen die Elastase eingesetzt. Hierbei wurden sowohl die Kulturüberstände, als auch die Bakterienzellen selbst untersucht. Die Untersuchungen zeigten, dass im Verlauf der Reifung das 62,7 kDa

schwere Präproprotein mit einer Länge von 588 Aminosäureresten sekretiert und die 19 Reste lange Signalsequenz abgespalten wird. Als nächstes wird ein N-terminales Propeptid (164 Aminosäuren) entfernt. Das entstehende Zwischenprodukt weist ein Molekulargewicht von 43,4 kDa auf und wird durch Abspaltung des annähernd 6 kDa schweren C-terminalen Propeptids unter Freisetzung der aktiven Form mit einem Molekulargewicht von 38 kDa weiter prozessiert. Die Abspaltung der Propeptide erfolgt autokatalytisch.

Im Rahmen der Untersuchungen zur Aktivierung des Präproproteins des Prothrombin-Aktivators könnte auch das C-terminale Ende des reifen Enzyms lokalisiert werden. Der Beginn des C-terminalen Propeptids ist im Falle der homologen Proteine Elastase bzw. Pro-Aminopeptidase Processing Protease ebenfalls noch unbekannt. Das Vorhandensein eines Propeptids am C-Terminus ergibt sich schon aus der Beobachtung, dass das experimentell ermittelte Molekulargewicht des reifen Prothrombin-Aktivators (35 kDa) geringer ist, als das rechnerisch bestimmbare des C-terminalen Präproprotein-Fragments nach hydrolytischer Spaltung der Bindung His₁₈₃-Lys₁₈₄. Die Bestimmung des C-terminalen Endes des aktiven Enzyms könnte, bei bekanntem Molekulargewicht, Aminosäuresequenz und N-Terminus beispielsweise mittels MALDI-TOF-Analysen erfolgen.

Das im Verlauf der Prothrombin-Spaltung durch das bakterielle Enzym erhaltene, komplexe Muster an Fragmenten (Kap. 3.6.2) deutet darauf hin, dass Faktor II auf unterschiedlichen Wegen abgebaut werden kann. Einer oder einige dieser Abbauege führen zur Bildung aktiver Spaltprodukte. Ein interessanter Aspekt wäre die eingehendere Untersuchung der verschiedenen Spaltungswege und der dabei gebildeten Zwischenprodukte. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass authentisches α -Thrombin entsteht, das seinerseits zu einem aktiven 25 kDa Spaltprodukt und einem inaktiven 14 kDa Fragment (Kap. 3.6.3) prozessiert wird. Möglicherweise lassen sich die äußeren Bedingungen dahingehend optimieren, dass im Verlauf der Prothrombin-Spaltung hauptsächlich der zur Bildung von Thrombin führende Weg beschritten wird. Im Hinblick auf eine Anwendung des bakteriellen Enzyms in der Diagnostik und Analytik von Faktor II wäre das relevant, um eine höhere Sensitivität zu erreichen.

MALDI-TOF-Untersuchungen könnten zur Ermittlung der C-Termini der nach der Spaltung von Prothrombin durch das bakterielle Enzym entstehenden, aktiven 35 bzw. 25 kDa Fragmente eingesetzt werden. So könnte geklärt werden, ob auch die

carboxyterminale Aminosäuresequenz der 35 kDa Protease mit der des authentischen α -Thrombins übereinstimmt. Eine Analyse des aktiven 25 kDa-Aktivierungsproduktes sollte dann die bereits per Edman-Abbau lokalisierte Spaltstelle des bakteriellen Enzyms in α -Thrombin bzw. Prothrombin zwischen Asn₄₇₁-Val₄₇₂ bestätigen.

Ein weiterer Aspekt der Untersuchung der durch die bakterielle Protease erzeugten Prothrombin-Aktivierungsprodukte wäre der im Folgenden beschriebene Unterschied bezüglich der Gerinnungsaktivität zu anderen Prothrombin- bzw. α -Thrombin-Spaltprodukten: Die in Kapitel 3.2.1 beschriebenen Experimente zeigen, dass das gebildete α -Thrombin durch die bakterielle Protease weiter abgebaut wird unter Freisetzung eines „aktiven“ 25 kDa- und eines 14 kDa-Fragments. Ein anderer Hinweis, dass die Entstehung dieser Spaltprodukte nicht die Folge einer Autolyse des α -Thrombins, sondern des Einwirkens der bakteriellen Protease ist, besteht darin, dass die ermittelte Spaltstelle (Asn₄₇₁-Val₄₇₂) in α -Thrombin nicht identisch ist mit der (Lys₄₇₄-Gly₄₇₅), die durch autolytische Spaltung des α -Thrombins zur Bildung von β' -Thrombin führt (siehe Kap. 1.2). α -Thrombin spaltet Peptidbindungen carboxyterminal von Arg- bzw. Lys-Resten (siehe unten). Eine Spaltung nach Asn wäre untypisch. β' -Thrombin unterscheidet sich bezüglich Länge und Struktur nur geringfügig von dem 25 kDa-Fragment, welches bei Spaltung des α -Thrombins durch die bakterielle Protease gebildet wird. Dasselbe trifft auf ϵ -Thrombin bzw. ζ -Thrombin zu, die durch Elastase- bzw. Kathepsin G-Spaltung des α -Thrombins bei Ala₄₇₀-Asn₄₇₁ bzw. Trp₄₆₈-Thr₄₆₉ entstehen (Brower et al., 1987; Brezniak et al., 1990). Alle oben genannten Spaltproduktes des α -Thrombins weisen eine mit α -Thrombin vergleichbare amidolytische Wirkung auf künstliche Tripeptid-*p*-nitroanilide als Substrate auf (Chang, 1986; Fenton, 1986; Fenton & Bing, 1986). Unterschiede bestehen aber bezüglich ihrer gerinnungsaktivierenden Wirkung. Während β' -Thrombin die Gerinnung nicht auslösen kann, verfügen ϵ -Thrombin und ζ -Thrombin noch über 30 % der Gerinnungsaktivität von α -Thrombin. Im Gegensatz dazu haben die Produkte einer Spaltung des α -Thrombins durch das bakterielle Enzym eine im Vergleich zu α -Thrombin identische Gerinnungsaktivität.

Sowohl im Hinblick auf die genauere Analyse des Aktivierungsvorgangs des bakteriellen Enzyms, als auch allgemein für die Herstellung größerer Mengen (beispielsweise für einen potentiellen Einsatz in der biomedizinischen Analytik) könnte eine

kombinante Herstellung des Prothrombin-Aktivators angestrebt werden. Möglicherweise lassen sich durch Überexpression mit anschließender Reinigung höhere Ausbeuten als bei der Isolierung ausgehend von einer konventionellen *Aeromonas hydrophila*-Kultur erzielen. Ebenfalls im Zusammenhang mit einer rekombinanten Herstellung könnte eine Optimierung der enzymatischen Aktivität bezüglich der Prothrombin-Spaltung durch gerichtete Mutagenese erfolgen. Über einen gezielten Austausch von Aminosäureresten im aktiven Zentrum könnte eine weitere Steigerung der Prothrombin-Aktivierungsrate angestrebt werden. Insbesondere könnte auf diese Weise angestrebt werden, das Reaktionsoptimum, welches bei dem „Wildtyp“ des Enzyms bei unphysiologischen Salzkonzentrationen (0 bzw. 1,5 M) und pH 6 liegt, zu verändern und an die Verhältnisse im Blut (150 mM NaCl, pH 7,4) anzupassen. Das wäre sinnvoll für einen Einsatz der bakteriellen Protease in der Analytik von Blut und Blutprodukten.

Eine direkte Spaltung künstlicher chromogener und fluorogener Peptid-Substrate, die in der Analytik aktivierter Proteasen der Gerinnung bzw. Fibrinolyse weitverbreitet eingesetzt werden, konnte nicht festgestellt werden. Das trifft auch auf spezifische chromogene und fluorogene Substrate für Faktor Xa und Thrombin zu, die teilweise anhand authentischer Spaltstellen in den makromolekularen Substratmolekülen entwickelt wurden. In dieser Hinsicht ähnelt das *Aeromonas hydrophila*-Enzym der Metalloprotease Ecarin aus dem *Echis carinatus venom*, die chromogene Faktor Xa-Substrate (z.B. S-2222) und Thrombin-Substrate ebenfalls nicht spaltet (Morita & Iwanaga, 1978; Rhee et al., 1982). Offensichtlich liegt im Fall der bakteriellen Metalloprotease ein völlig anderes Prinzip der Substraterkennung und/oder des katalytischen Mechanismus vor als bei der Serinprotease Faktor Xa.

Serin-Proteasen enthalten im aktiven Zentrum neben einen Histidin- und einem Aspartat-Rest auch einen Serinrest, der sich durch eine besonders hohe Reaktivität auszeichnet (Kossiakoff, 1987). Die drei Reste bilden eine „katalytische Triade“ und sind am katalytischen Mechanismus beteiligt. Die Reaktionssequenz der hydrolytischen Spaltung einer Peptidbindung lässt sich in eine Acylierungs- und Deacylierungsreaktion unterteilen und verläuft nach einer allgemeinen Säure-Base-Katalyse durch den Histidin-Rest. Dieser fungiert zunächst als Base, wobei er ein Proton von der Hydroxylgruppe des Serin-Rests abstrahiert und später als Säure unter Übertragung eines Protons auf die Aminaustrittsgruppe. Die Acylierungsreaktion führt zur Bildung einer Aminaustrittskomponente und eines Acyl-Enzym-Intermediats. Danach

folgt der Deacylierungsschritt, bei dem ein Wassermolekül die Acylgruppe nukleophil angreift, wodurch der Serin-Rest freigesetzt wird und das Produkt vom Enzym dissoziiert.

Dahingegen weisen Zink-Metalloproteasen als konserviertes Element im aktiven Zentrum (Bestandteil des Zinkfinger-Motivs) die Sequenz HEXXH (H = Histidin, E = Glutamat, X = beliebige Aminosäure) auf (Cummins et al., 1999), die auch in der Primärstruktur der *Aeromonas hydrophila*-Protease enthalten ist (mit His₃₂₁, Glu₃₂₂ und His₃₂₅). Die funktionelle Bedeutung der His- bzw. Glu-Reste der HEXXH-Sequenz wurde durch Mutationsanalysen ermittelt. Durch ortsgerichtete Mutagenese wurden diese Reste gegen Alanin ausgetauscht und die so generierten Proteinmutanten rekombinant exprimiert. Sie zeigten eine im Vergleich zum Wildtyp stark verminderte Aktivität. An dem katalytischen Mechanismus der Metalloproteasen ist ein Zink-Ion, das von den beiden Histidin-Resten der HEXXH-Sequenz und einem dritten Liganden (20-120 Reste entfernt) komplexiert wird, und ein Wassermolekül beteiligt (Kunugi et al., 1982). Der Glutamat-Rest des oben beschriebenen Motivs bildet eine Wasserstoffbrückenbindung zu einem H-Atom des Wassermoleküls aus. Daraufhin orientiert sich das Wassermolekül auf eine Weise, die die Koordinierung des Sauerstoffatoms an das Zink-Ion ermöglicht. Auf diese Weise wird das Wassermolekül „aktiviert“ und kann über die freien Elektronenpaare am Sauerstoff-Atom einen nukleophilen Angriff auf das Kohlenstoffatom der Carbonylgruppe einer Peptidbindung des Substratmoleküls starten. Gleichzeitig nimmt der Glutamat-Rest ein Proton des H₂O-Moleküls auf. Eine tetraedrische Zwischenstufe (Abbildung 38) entsteht, die durch elektrostatische Wechselwirkungen mit dem Zn²⁺-Ion stabilisiert wird.

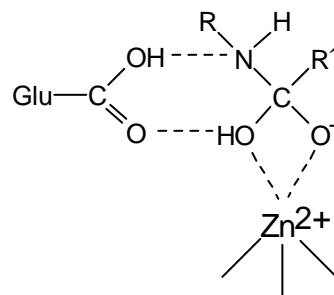
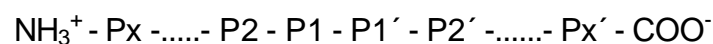


Abbildung 38: Die bei der hydrolytischen Spaltung einer Peptidbindung durch eine Zink-Metalloprotease auftretende tetraedrische Zwischenstufe wird durch elektrostatische Wechselwirkungen mit dem Zn²⁺-Ion stabilisiert.

Im nächsten Schritt erfolgt die Übertragung eines Protons der Carboxylgruppe des Glutaminsäurerests auf die Amin-Komponente. Die Peptidbindung wird gespalten und die Produkten der proteolytischen Spaltung diffundieren weg vom aktiven Zentrum. Möglicherweise entspricht der oben beschriebene katalytische Mechanismus dem der Protease aus *Aeromonas hydrophila*. Eine genauere Untersuchung der Spaltung von Prothrombin und anderer Proteine (eventuell durch Mutanten des bakteriellen Enzyms mit einen Aminosäureaustausch in der HEXXH-Sequenz) könnte interessante Erkenntnisse über den Reaktionsmechanismus des Prothrombin-Aktivators liefern.

Obwohl sich die Serinproteasen Trypsin, Chymotrypsin und Elastase hinsichtlich Struktur und Reaktionsmechanismus ähneln, bestehen Unterschiede bezüglich ihrer Substratspezifität. Die Ursache dafür sind Strukturunterschiede in der primären Substratbindestelle, die mit einer Aminosäureseitenkette des Substrats wechselwirkt. Diese individuellen Differenzen bestimmen den chemischen und sterischen Charakter der bevorzugten Substratseitenketten (Bode et al., 1989). Die spezifische Erkennungsstelle der oben genannten Proteasen liegt in unmittelbarer Nachbarschaft des Serin-Rests im aktiven Zentrum. Der P1-Aminosäurerest des Substrats interagiert mit den Resten der Substratbindetasche und orientiert bzw. positioniert die zu spaltende Peptidbindung P1-P1'. Die Bezeichnung der Reste im Substrat erfolgt gemäß der Nomenklatur von Schechter und Berger (1967):



Anhand ihrer Substratspezifität lassen sich die Serinproteasen in trypsinähnliche (P1 = Arg oder Lys), chymotrypsinähnliche (P1 = Tyr, Trp, Phe) und elastaseähnliche (P1 = Val, Ala, Leu, Ile) Enzyme einteilen. Faktor Xa gehört zur Klasse der trypsinähnlichen Serinproteasen. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit eingesetzten chromogenen und fluorogenen Substrate enthalten an Position P1 einen Arg-Rest und sind für die Spaltung durch trypsinähnliche Serinproteasen konzipiert.

Die Nichtumsetzung dieser Substrate durch den bakteriellen Prothrombin-Aktivator weist darauf hin, dass diese Metalloprotease eine andere Substratspezifität hat. Möglicherweise bestehen Strukturunterschiede in der primären Substratbindestelle, die sich vielleicht auch an einer anderen Position im Enzym befindet. Eventuell spielen hier im Substratmolekül bestimmte Strukturelemente neben der Sequenz eine wesentliche Rolle für die Substraterkennung. Prinzipielle Unterschiede bezüglich der Substraterkennung zwischen den oben beschriebenen Serinproteasen und Metal-

loproteasen zeigen sich bei folgenden Beispielen: Im Falle der bakteriellen Metalloprotease Thermolysin begünstigen hydrophobe Reste an P1 die Bindung des Substrats. Darüber hinaus sind aber auch hydrophobe Reste an P2' sowie Leu oder Phe an P1' entscheidend (Kunugi et al., 1982). Die in Gehirn, Schleim und Keimdrüsen vorkommende Endopeptidase EC 3.4.24.15 spaltet bevorzugt Peptidbindungen carboxyterminal von hydrophoben Resten (an Position P1). Ferner tragen Aminosäurereste mit hydrophoben oder sperrigen Seitenketten an den Positionen P2 und P3' im Substrat zur Bindung an das Enzym bei (Cummins et al., 1999). Bei Metalloproteasen spielen demnach auch die Positionen P1', P2' und P3' eine Rolle für die Substraterkennung. Diese Positionen sind aber in den eingesetzten chromogenen und fluorogenen Substratmolekülen nicht enthalten.

Der Prothrombin-Aktivator aus *Aeromonas hydrophila* spaltet Prothrombin an den Peptidbindungen Arg₃₂₀-Ile₃₂₁ und Asn₄₇₁-Val₄₇₂. An den Positionen P2 und P2' befinden sich kleine bzw. hydrophobe Reste (Gly, Val bzw. Ala) (Kap. 1.2). Aminosäurereste mit hydrophoben Seitenketten (Val, Ile) zeigen sich auch bei P1'. An Position P1 befinden sich polare geladene (Arg) bzw. ungeladene (Asn) Reste. Die Analyse weiterer Spaltstellen in Prothrombin oder anderen Substraten sollte den chemischen und sterischen Charakter der bevorzugten Substratseitenketten an den verschiedenen Positionen klären und somit nähere Einblicke in die Substratbindung der Protease aus *Aeromonas hydrophila* ermöglichen.

Durch SDS-PAGE und Western-Blot-Analysen konnte bereits gezeigt werden, dass neben Prothrombin zahlreiche andere Gerinnungsfaktoren bzw. Plasmaproteine gespalten werden (Kap. 3.2.2). Neben der Untersuchung der Prothrombin-Aktivierung könnte auch eine weiterführende Analyse der Prozessierung und der dabei beschrittenen Abbauwege anderer Plasmaproteine ein Gegenstand zukünftiger Forschungen sein. Interessant wäre es auch zu klären, ob bestimmte Proteine, wie beispielsweise Faktor IX, X oder XIII, im Rahmen ihrer Spaltung auch aktiviert werden. Vielleicht stellt der bakterielle Prothrombin-Aktivator auch ein geeignetes diagnostisches Werkzeug zur Analyse dieser Gerinnungsfaktoren dar.

Das Enzym aus *Aeromonas hydrophila* weist eine hohe Sequenzhomologie zu etlichen Metalloproteasen aus *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio proteolyticus*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio anguillarum* und *Vibrio vulnificus* auf (David et al., 1992; Hase & Finkelstein, 1991; Cheng et al., 1996; Milton et al., 1992; Fukushima et al., 1989), die teils als Pathogenitätsfaktoren eingestuft werden. Eine eingehendere Charakterisie-

rung der Eigenschaften dieser verwandten Proteasen könnte Hinweise auf die physiologische Funktion des *Aeromonas hydrophila*-Enzyms und seine potentielle Bedeutung als Pathogenitätsfaktor liefern.

5. Literatur

- Altwegg, M. & Geiss, H.K. (1989): *Aeromonas* as a human pathogen. *Crit. Rev. Microbiol.*; **16**: 253-286
- Austin, B. & Austin, D.A. (1993): Bacterial fish pathogens, 2nd ed. Ellis Horwood, Chichester, United Kingdom
- Bajaj, S.P., Butkowski, R.J. & Mann, K.G. (1975): Prothrombin fragments: Ca²⁺ binding and activation kinetics. *J. Biol. Chem.*; **250**: 2150-2156
- Barnes, W.M. (1994): PCR amplification of up to 35-kb DNA with high fidelity and high yield from lambda bacteriophage templates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*; **91**: 2216-2220
- Bennett, J.S., Vilaire, G. & Cines, D.B. (1982): Identification of the fibrinogen receptor on human platelets by photoaffinity labeling. *J. Biol. Chem.*; **257**: 8049-8054
- Bode, W., Mayr, I., Baumann, U., Huber, R., Stone, S.R. & Hofsteenge, J. (1989): The refined 1.9 Å crystal structure of human α -thrombin: interaction with D-Phe-Pro-Arg chloromethylketone and significance of the Tyr-Pro-Pro-Trp insertion segment. *EMBO J.*, **8**: 3467-3475
- Bode, W., Meyer Jr., E. & Powers, J. (1989): Human leukocyte and porcine pancreatic elastase: x-ray crystal structures, mechanism, substrate specificity, and mechanism-based inhibitors. *Biochemistry*, **28**: 1951-1963
- Blombäck, J.G., Hessel, B., Hogg, D. & Claesson, G. (1977): Substrate specificity of thrombin on proteins and synthetic substrates. In: Chemistry and Biology of Thrombin (Lundblad, R.L., Fenton II, J.W. & Mann, K.G., Hrsg), pp. 275-290, Ann Arbor Science Publisher, Ann Arbor, Michigan.
- Bouma, B.N., Kerbiriou, D.M., Baker, J. & Griffin, J.H. (1986): Characterization of a variant prekallikrein, prekallikrein Long Beach, from a family with mixed cross-reacting material-positive and cross-reacting material-negative prekallikrein deficiency. *J. Clin. Invest.*; **78**:170-176
- Brezniak, D.V., Brower, M.S., Witting, J.I., Walz, D.A. & Fenton, J.W. 2d. (1990): Human alpha- to zeta-thrombin cleavage occurs with neutrophil cathepsin G or chymotrypsin while fibrinogen clotting activity is retained. *Biochemistry*; **29**: 3536-3542
- Brower, M.S., Walz, D.A., Garry, K.E. & Fenton, J.W. 2d. (1987): Human neutrophil elastase alters human alpha-thrombin function: limited proteolysis near the gamma-cleavage site results in decreased fibrinogen clotting and platelet-stimulatory activity. *Blood*; **69**: 813-819
- Broze, G.J. Jr., Leykam, J.E., Schwartz, B.D. & Miletich, J.P. (1985): Purification of human brain tissue factor. *J. Biol. Chem.*; **260**: 10917-10920

- Broze, G.J. Jr., Warren, L.A., Novotny, W.F., Higuchi, D.A., Girard, J.J. & Miletich, J.P. (1988): The lipoprotein-associated coagulation inhibitor that inhibits the factor VII-tissue factor complex also inhibits factor Xa: insight into its possible mechanism of action. *Blood*; **71**: 335-343
- Broze, G.J. Jr., Girard T.J. & Novotny W.F. (1990): Regulation of coagulation by a multivalent Kunitz-type inhibitor. *Biochemistry*; **29**: 7539-7546
- Broze, G.J. Jr. (1992): The role of tissue factor pathway inhibitor in a revised coagulation cascade. *Semin. Hematol.*; **29**: 159-169
- Broze, G.J. Jr. (1992): Tissue factor pathway inhibitor and revised hypothesis of blood coagulation. *Trends Cardiovasc. Med.*; **2**: 72-77
- Butenas, S., van't Veer, C. & Mann, K.G. (1999): „Normal“ thrombin generation. *Blood*; **94**: 2169-2178
- Carney, D.H., Stiernberg, J. & Fenton, J.W. 2d. (1984): Initiation of proliferative events by human alpha-thrombin requires both receptor binding and enzymic activity. *J. Cell. Biochem.*; **26**: 181-195
- Cascon, A., Yugueros, J., Temprano, A., Sanchez, M., Hernanz, C., Luengo, J.M. & Naharro, G. (2000): A major secreted elastase is essential for pathogenicity of *Aeromonas hydrophila*. *Infect. Immun.*; **68**: 3233-3241
- Chang, J.Y. (1986): The structures and proteolytic specificities of autolysed human thrombin. *Biochem. J.*; **240**: 797-802
- Cheng, J.C., Shao, C.P. & Hor, L.I. (1996): Cloning and nucleotide sequencing of the protease gene of *Vibrio vulnificus*. *Gene*; **183**: 255-257
- Collen, D. (1980): On the regulation and control of fibrinolysis. *Thromb. Haemost.*; **43**: 77-89
- Cross, A.S., Sadoff, J.C., Iglewski, B.H. & Sokol, P.A. (1980): Evidence for the role of toxin A in the pathogenesis of infection with *Pseudomonas aeruginosa* in humans. *J. Infect. Dis.*; **142**: 538-546
- Cummins, P.M., Pabon, A., Margulies, E.H. & Glucksman, M.J. (1999): Zinc coordination and substrate catalysis within the neuropeptide processing enzyme endopeptidase EC 3.4.24.15. Identification of active site histidine and glutamate residues. *J. Biol. Chem.*; **274**: 16003-16009
- David, V.A., Deutch, A.H., Sloma, A., Pawlyk, D., Ally, A. & Durham, D.R. (1992): Cloning, sequencing and expression of the gene encoding the extracellular neutral protease, vibriolysin, of *Vibrio proteolyticus*. *Gene*; **112**: 107-112
- Davie, E.W. & Ratnoff, O.D. (1964): Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. *Science*; **145**: 1310-1312

- Davie, E.W. & Fujikawa, K. (1975): Basic mechanisms in blood coagulation. *Annu. Rev. Biochem.*; **44**: 799-829
- Davie, E.W., Fujikawa, K. & Kisiel, W. (1991): The coagulation cascade: initiation, maintenance, and regulation. *Biochemistry*, **30**: 10363-10370
- Degan, S.J.F., MacGillivray, R.T. & Davie, E.W. (1983): Characterization of the complementary deoxyribonucleic acid and gene coding for human prothrombin. *Biochemistry*; **22**: 2087-2097
- Del Corral, F., Shotts, E.B. & Brown, J. (1990): Adherence, haemagglutination, and cell surface characteristics of motile aeromonads virulent for fish. *J. Fish Dis.*; **13**: 255-268
- DiScipio, R.G., Kurachi, K. & Davie, E.W. (1978): Activation of human factor IX (Christmas factor). *J. Clin. Invest.*; **61**, 1528-1538
- Dombrose, F.A., Gitel, S.N., Zawulich, K. & Jackson, C.M. (1979): The association of bovine prothrombin fragment 1 with phospholipid. Quantitative characterization of the Ca^{2+} ion-mediated binding of prothrombin fragment 1 to phospholipid vesicles and a molecular model for its association with phospholipids. *J. Biol. Chem.*; **254**: 5027-5040
- Downing, M.R., Butkowski, R.J., Clark, M.M. & Mann, K.G. (1975): Human prothrombin activation. *J. Biol. Chem.*; **250**: 8897-8906
- Drapeau, G.R. (1978): Role of metalloprotease in activation of the precursor of staphylococcal protease. *J. Bacteriol.*; **136**: 607-613
- Eaton, D., Rodriguez, H. & Vehar, G.A. (1986): Proteolytic processing of human factor VIII. Correlation of specific cleavages by thrombin, factor Xa, and activated protein C with activation and inactivation of factor VIII coagulant activity. *Biochemistry*; **25**: 505-512
- Edman, P. & Henschen, A. (1975): Protein sequence determination. In: Molecular biology, biochemistry, biophysics 8 (Needleman, S.B., Hrsg.), pp. 232-279, Springer, Berlin
- Esmon, C.T. & Jackson, C.M. (1974): The conversion of prothrombin to thrombin. IV. The function of the fragment 2 region during activation in the presence of factor V. *J. Biol. Chem.*; **249**: 7791-7797
- Esmon, C.T. (1979): The subunit structure of thrombin-activated factor V. Isolation of activated factor V, separation of subunits, and reconstitution of biological activity. *J. Biol. Chem.*; **254**: 964-973
- Esmon, C.T. & Owen, W.G. (1981): Identification of an endothelial cell cofactor for thrombin-catalyzed activation of protein C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*; **78**: 2249-2252

- Esmon, C.T. (1987a): The regulation of natural anticoagulant pathways. *Science*; **235**: 1348-1352
- Esmon, C.T. (1989): The roles of protein C and thrombomodulin in the regulation of blood coagulation. *J. Biol. Chem.*; **264**: 4743-4746
- Esmon, N.L., Owen, W.G. & Esmon, C.T. (1982): Isolation of a membrane-bound cofactor for thrombin-catalyzed activation of protein C. *J. Biol. Chem.*; **257**: 859-864
- Esmon, N.L. (1987b): Thrombomodulin. *Semin. Thromb. Hemost.*; **13**: 454-463
- Esmon, N.L. & Esmon C.T. (1988): Protein C and the endothelium. *Semin. Thromb. Hemost.*; **14**: 210-215
- Fay, P.J. (1988): Subunit structure of thrombin-activated human factor VIIIa. *Biochim. Biophys. Acta*; **952**: 181-190
- Fenton, J.W. 2d. (1986): Thrombin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*; **485**: 5-15
- Fenton, J.W. 2d. (1988a): Regulation of thrombin generation and functions. *Semin. Thromb. Hemost.*; **14**: 234-240
- Fenton, J.W. 2d. (1988b): Thrombin bioregulatory functions. In: Enzymes – Tools and Targets. *Adv. Clin. Enzymol.*; **6**: 186-193
- Fenton, J.W. 2d. & Bing, D.H. (1986): Thrombin active-site regions. *Semin. Thromb. Hemost.*; **12**: 200-208
- Folk, J.E. & Finlayson, J.S. (1977): The epsilon-(gamma-glutamyl)lysine crosslink and the catalytic role of transglutaminases. *Adv. Protein Chem.*; **31**: 1-133
- Fukushima, J., Yamamoto, S., Morihara, K., Atsumi, Y., Takeuchi, H., Kawamoto, S. & Okuda, K. (1989): Structural gene and complete amino acid sequence of *Pseudomonas aeruginosa* IFO 3455 elastase. *J. Bacteriol.*; **171**: 1698-1704
- Furie, B. & Furie, B.C. (1988): The molecular basis of blood coagulation. *Cell*; **53**: 505-518
- Fussle, R., Bhakdi, S., Sziegoleit, A., Tranum-Jensen, J., Kranz, T. & Wellensiek, H.J. (1981): On the mechanism of membrane damage by *Staphylococcus aureus* alpha-toxin. *J. Cell. Biol.*; **91**: 83-94
- Gailani, D. & Broze, G.J. Jr. (1991): Factor XI activation in a revised model of blood coagulation. *Science*; **253**: 909-912
- Girard, T.J., Warren, L.A., Novotny, W.F., Likert, K.M., Brown, S.G., Miletich, J.P. & Broze, G.J. Jr. (1989): Functional significance of the Kunitz-type inhibitory domains of lipoprotein-associated coagulation inhibitor. *Nature*; **338**: 518-520
- Girma, J.P., Meyer, D., Verweij, C.L., Pannekoek, H. & Sixma, J.J. (1987): Structure-function relationship of human von Willebrand factor. *Blood*; **70**: 605-611

- Griffith, M.J. (1986): Inhibitors: antithrombin III and heparin. In: Blood Coagulation (Zwaal, R.F.A. & Hemker, H.C., Hrsg.), pp. 259-283, Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford.
- Hageman, T.C., Endres, G.F. & Scheraga, H.A. (1975): Mechanism of action of thrombin on fibrinogen. On the role of the A chain of bovine thrombin in specificity and in differentiating between thrombin and trypsin. *Arch. Biochem. Biophys.*; **171**: 327-336
- Hase, C.C. & Finkelstein, R.A. (1991): Cloning and nucleotide sequence of the *Vibrio cholerae* hemagglutinin/protease (HA/protease) gene and construction of an HA/protease-negative strain. *J. Bacteriol.*; **173**: 3311-3317
- Hatton, M.W. (1973): Studies on the coagulant enzyme from *Agkistrodon rhodostoma* venom. Isolation and some properties of the enzyme. *Biochem. J.*; **131**: 799-807
- Heeb, M.J. & Griffin, J.H. (1988): Physiologic inhibition of human activated protein C by alpha 1-antitrypsin. *J. Biol. Chem.*; **263**: 11613-11616
- Hedner, U. & Davie, E.W. (1987). In: Hemostasis and Thrombosis (Colman, R.W., Hirsh, J., Marder, V.J. & Salzman, E.W., Hrsg.), pp. 39-47, J.B. Lippincott Co., Philadelphia, PA.
- Hemker, H.C. & Frank, H.L. (1985): The mechanism of action of oral anticoagulants and its consequences for the practice of oral anticoagulation. The mechanism of action of oral anticoagulants and its consequences for the practice of oral anticoagulation. *Haemostasis*; **15**: 263-270
- Hendrix, H., Lindhout, T., Mertens, K., Engels, W. & Hemker, H.C. (1983): Activation of human prothrombin by stoichiometric levels of staphylocoagulase. *J. Biol. Chem.*; **258**: 3637-3644
- Henschen, A. & McDonagh, J. (1986): Fibrinogen, fibrin and factor XIII. In: Blood Coagulation (Zwaal, R.F.A. & Hemker, H.C., Hrsg.), pp. 171-241, Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford
- Hickey, M.J., Williams, S.A. & Roth, G.J. (1989): Human platelet glycoprotein IX: an adhesive prototype of leucine-rich glycoproteins with flank-center-flank structures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*; **86**: 6773-6777
- Hill, K.R., Caselitz, F.H. & Moody, L.M. (1954): A case of acute, metastatic, myositis caused by a new organism of the family *Pseudomonadaceae*. *West Indian Med. J.*; **3**: 9
- Holmberg, S.D., Schell, W.L., Fanning, G.R., Wachsmuth, I.K., Hickman-Brenner, F.W., Blake, P.A., Brenner, D.J. & Farmer, J.J. (1986): *Aeromonas* intestinal infections in the United States. *Ann. Intern. Med.*; **105**: 683-689
- Itoh, N., Tanaka, N., Mihashi, S. & Yamashina, I. (1987): Molecular cloning and sequence analysis of cDNA for batroxobin, a thrombin-like snake venom enzyme. *J. Biol. Chem.*; **262**: 3132-3135

- Jackson, C.M., Gordon, J.G. & Hanahan, D.J. (1971): Separation of the tosyl arginine esterase activity from the factor X activating enzyme of Russell's viper venom. *Biochim. Biophys. Acta*; **252**: 255-261
- Jackson, C.M. & Nemerson, Y. (1980): Blood coagulation. *Annu. Rev. Biochem.*; **49**: 765-811
- Jackson, C.M. (1984): The mammalian blood coagulation system. In: Methods of Enzymatic Analysis, Vol V (Bergmeyer, H.U., Hrsg.), pp. 316-351, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Dearfield Beach, Florida, Base.
- Janda, J.M. (1985): Biochemical and exoenzymatic properties of *Aeromonas* species. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*; **3**: 223-232
- Janda, J.M. & Duffey, P.S. (1988): Mesophilic aeromonads in human disease: current taxonomy, laboratory identification, and infectious disease spectrum. *Rev. Infect. Dis.*; **10**: 980-997
- Janus, T.J., Lewis, S.D., Lorand, L. & Shafer, J.A. (1983): Promotion of thrombin-catalyzed activation of factor XIII by fibrinogen. *Biochemistry*; **22**: 6269-6272
- Joanne, M.R., Houston, C.W. & Kurosky, A. (1989): Bioactivity and immunological characterization of a cholera toxin-cross-reactive cytolytic enterotoxin from *Aeromonas hydrophila*. *Infect. Immun.*; **57**: 1170-1179
- Jordan, R.E., Oosta, G.M., Gardner, W.T. & Rosenberg, R.D. (1980): The kinetics of hemostatic enzyme-antithrombin interactions in the presence of low molecular weight heparin. *J. Biol. Chem.*; **255**: 10081-10090
- Kanaide, H. & Shainoff, J.R. (1975): Cross-linking of fibrinogen and fibrin by fibrin-stabilizing factor (factor XIIIa). *J. Lab. Clin. Med.*; **85**: 574-97
- Kaplan, A.P. (1978): Initiation of the intrinsic coagulation and fibrinolytic pathways of man: the role of surfaces, hageman factor, prekallikrein, high molecular weight kininogen, and factor XI. *Prog. Hemost. Thromb.*; **4**: 127-175
- Kawabata, S., Morita, T., Iwanaga, S. & Igarashi, H. (1985): Enzymatic properties of staphylothrombin, an active molecular complex formed between staphylocoagulase and human prothrombin. *J. Biochem. (Tokyo)*; **98**: 1603-1614
- Kisiel, W., Hermodson, M.A. & Davie, E.W. (1976): Factor X activating enzyme from *Russell's viper venom*: isolation and characterization. *Biochemistry*; **15**: 4901-4906
- Kisiel, W., Canfield, W.M., Ericsson, L.H. & Davie, E.W. (1977): Anticoagulant properties of bovine plasma protein C following activation by thrombin. *Biochemistry*; **16**: 5824-5831
- Kossiakoff, A.A. (1987): Catalytic properties of trypsin. In: Biological Macromolecules and Assemblies (Jurnak, F.A. & McPherson, A., Hrsg.), pp. 369-412, John Wiley & Sons, New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore.

- Kunugi, S., Hirohara, H. & Ise, N. (1982): pH and temperature dependences of thermolysin catalysis. Catalytic role of zinc-coordinated water. *Eur. J. Biochem.*; **124**: 157-163
- Kurachi, K., Fujikawa, K., Schmer, G. & Davie, E.W. (1976): Inhibition of bovine factor IXa and factor Xa by antithrombin III. *Biochemistry*; **15**: 373-377
- Kurachi, K. & Davie, E.W. (1977): Activation of human factor XI (plasma thromboplastin antecedent) by factor XIIa (activated Hageman factor). *Biochemistry*; **16**: 5831-5839
- Laemmli, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*; **227**: 680-685
- Lakai, K. (1972): The biological role of the clot-stabilizing enzymes: Transglutaminase and factor XIII. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*; **202**: 1-348
- Letellier, L., Howard, S.P. & Buckley, J.T. (1997): Studies on the energetics of proaerolysin secretion across the outer membrane of *Aeromonas* species. Evidence for a requirement for both the protonmotive force and ATP. *J. Biol. Chem.*; **272**: 11109-11113
- Liu, C.Y., Nossel, H.L. & Kaplan, K.L. (1979): The binding of thrombin by fibrin. *J. Biol. Chem.*; **254**: 10421-10425
- Lollar, P. & Parker, C.G. (1989): Subunit structure of thrombin-activated porcine factor VIII. *Biochemistry*; **28**: 666-674
- Lopez, J.A., Chung, D.W., Fujikawa, K., Hagen, F.S., Davie, E.W. & Roth, G.J. (1988): The alpha and beta chains of human platelet glycoprotein Ib are both transmembrane proteins containing a leucine-rich amino acid sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*; **85**: 2135-2139
- MacFarlane, R.G. (1964): An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biochemical amplifier. *Nature*; **202**: 498-499
- MacGillivray, R.T. & Davie, E.W. (1984): Characterization of bovine prothrombin mRNA and its translation product. *Biochemistry*; **23**: 1626-1634
- Magnusson, S., Sottrup-Jensen, L., Petersen, T.E., Morris, H.R. & Dell, A. (1974): Primary structure of the vitamin K-dependent part of prothrombin. *FEBS Lett.*; **44**: 189-193
- Magnusson, S., Peterson, T.E., Sottrup-Jensen, L. & Claeys, H. (1975): Complete primary structure of prothrombin: Isolation, structure and reactivity of ten carboxylated glutamic acid residues and regulation of prothrombin activity by thrombin. In: *Proteases and Biological Control* (Reich, E., Rifkin, D.B. & Shaw, E., Hrsg.), Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory

- Malhotra, O.P., Nesheim, M.E. & Mann, K.G. (1985): The kinetics of activation of normal and gamma-carboxyglutamic acid-deficient prothrombins. *J. Biol. Chem.*; **260**: 279-287
- Mann, K.G. (1987): The assembly of blood clotting complexes on membranes. *Trends Biochem. Sci.*; **12**: 229-233
- Mann, K.G., Jenny, R.J. & Krishnaswamy, S. (1988): Cofactor proteins in the assembly and expression of blood clotting enzyme complexes. *Annu. Rev. Biochem.*; **57**: 915-956
- Mann, K.G. (1994): Prothrombin and Thrombin. In: Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice, Third Edition (Colman, R.W., Hirsh, J., Marder, V.J. & Salzman, E.W., Hrsg.), pp. 184-199, J.B. Lippincott Company, Philadelphia
- Markland, F.S. & Damus, P.S. (1971): Purification and properties of a thrombin-like enzyme from the venom of *Crotalus adamanteus* (Eastern diamondback rattlesnake). *J. Biol. Chem.*; **246**: 6460-6473
- Markland, F.S. & Pirkle, H. (1977): Thrombin-like enzyme from the venom of *Crotalus adamanteus* (eastern diamondback rattlesnake). *Thromb. Res.*; **10**: 487-494
- Marlar, R.A., Kleiss, A.J. & Griffin, J.H. (1982): An alternative extrinsic pathway of human blood coagulation. *Blood*; **60**: 1353-1358
- Matsudaira, P.T. (1989): A Practical guide on protein and peptide purification for microsequencing (Matsudaira, P.T., Hrsg.), Academic Press, San Diego
- McDuffie, F.C., Giffin, C., Niedringhaus, R., Mann, K.G., Owen, C.A., Bowie, E.J., Peterson, J., Clark, G. & Hunder, G.G. (1979): Prothrombin, thrombin and prothrombin fragments in plasma of normal individuals and of patients with laboratory evidence of disseminated intravascular coagulation. *Thromb. Res.*; **16**: 759-773
- McLean, J.W., Tomlinson, J.E., Kuang, W.J., Eaton, D.L., Chen, E.Y., Fless, G.M., Scanu, A.M. & Lawn, R.M. (1987): cDNA sequence of human apolipoprotein(a) is homologous to plasminogen. *Nature*; **330**: 132-137
- Milton, D.L., Norqvist, A. & Wolf-Watz, H. (1992): Cloning of a metalloprotease gene involved in the virulence mechanism of *Vibrio anguillarum*. *J. Bacteriol.*; **174**: 7235-7244
- Monkovic, D.D. & Tracy P.B. (1990): Activation of human factor V by factor Xa and thrombin. *Biochemistry*; **29**: 1118-1128
- Morita, T. & Iwanaga, S. (1978): Purification and properties of prothrombin activator from the venom of *Echis carinatus*. *J. Biochem. (Tokyo)*; **83**: 559-570

- Morita, T. & Jackson, C.M. (1986): Preparation and properties of derivatives of bovine factor X and factor Xa from which the gamma-carboxyglutamic acid containing domain has been removed. *J. Biol. Chem.*; **261**: 4015-4023
- Myrmel, K.H., Lundblad, R.L. & Mann, K.G. (1976): Characteristics of the association between prothrombin fragment 2 and alpha-thrombin. *Biochemistry*; **15**: 1767-1773
- Naito, K. & Fujikawa, K. (1991): Activation of human blood coagulation factor XI independent of factor XII. Factor XI is activated by thrombin and factor XIa in the presence of negatively charged surfaces. *J. Biol. Chem.*; **266**: 7353-7358
- Naski, M.C., Lorand, L. & Shafer, J.A. (1991): Characterization of the kinetic pathway for fibrin promotion of alpha-thrombin-catalyzed activation of plasma factor XIII. *Biochemistry*; **30**: 934-941
- Nelsestuen, G.L. & Suttie, J.W. (1972a): Mode of action of vitamin K. Calcium binding properties of bovine prothrombin. *Biochemistry*; **11**: 4961-4964
- Nelsestuen, G.L. & Suttie, J.W. (1972b): The purification and properties of an abnormal prothrombin protein produced by dicumarol-treated cows. A comparison to normal prothrombin. *J. Biol. Chem.*; **247**: 8176-8182
- Nelsestuen, G.L., Broderius, M. & Martin, G. (1976): Role of gamma-carboxyglutamic acid. Cation specificity of prothrombin and factor X-phospholipid binding. *J. Biol. Chem.*; **251**: 6886-6893
- Nelsestuen, G.L., Zytkevich, T.H. & Howard, J.B. (1974): The mode of action of vitamin K. Identification of gamma-carboxyglutamic acid as a component of prothrombin. *J Biol Chem*; **249**: 6347-6350
- Nemerson, Y. (1966): The reaction between bovine brain tissue factor and factors VII and X. *Biochemistry*; **5**: 601-608
- Nemerson, Y. & Repke, D. (1985): Tissue factor accelerates the activation of coagulation factor VII: the role of a bifunctional coagulation cofactor. *Thromb. Res.*; **40**: 351-358
- Nemerson, Y. & Gentry, R. (1986): An ordered addition, essential activation model of the tissue factor pathway of coagulation: evidence for a conformational cage. *Biochemistry*; **25**: 4020-4033
- Nesheim, M.E., Taswell, J.B. & Mann, K.G. (1979): The contribution of bovine Factor V and Factor Va to the activity of prothrombinase. *J. Biol. Chem.*; **254**: 10952-10962
- Nesheim, M.E. & Mann, K.G. (1979): Thrombin-catalyzed activation of single chain bovine factor V. *J. Biol. Chem.*; **254**: 1326-1334

- Nesheim, M.E., Abbott, T., Jenny, R. & Mann, K.G. (1988): Evidence that the thrombin-catalyzed feedback cleavage of fragment 1.2 at Arg154-Ser155 promotes the release of thrombin from the catalytic surface during the activation of bovine prothrombin. *J. Biol. Chem.*; **263**: 1037-1044
- Nirasawa, S., Nakajima, Y., Zhang, Z., Yoshida, M. & Hayashi, K. (1999): Molecular cloning and expression in *Escherichia coli* of the extracellular endoprotease of *Aeromonas caviae* T-64, a pro-aminopeptidase processing enzyme. *Biochim. Biophys. Acta*; **1433**: 335-342
- Nolan, C., Hall, L.S. & Barlow, G.H. (1976): Ancrod, the coagulating enzyme from Malayan pit viper (*Agkistrodon rhodostoma*) venom. *Methods Enzymol.*; **45**: 205-213
- Osterud, B. & Rapaport, S.I. (1977): Activation of factor IX by the reaction product of tissue factor and factor VII: additional pathway for initiating blood coagulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*; **74**: 5260-5264
- Owen, W.G. & Esmon, C.T. (1981): Functional properties of an endothelial cell cofactor for thrombin-catalyzed activation of protein C. *J. Biol. Chem.*; **256**: 5532-5535
- Paniagua, C., Rivero, O., Anguita, J. & Naharro, G. (1990): Pathogenicity factors and virulence for rainbow trout (*Salmo gairdneri*) of motile *Aeromonas* spp. Isolated from a river. *J. Clin. Microbiol.*; **28**: 350-355
- Park, C.H. & Tulinsky, A. (1986): Three-dimensional structure of the kringle sequence: structure of prothrombin fragment 1. *Biochemistry*; **25**: 3977-3982
- Patthy, L. (1985): Evolution of the proteases of blood coagulation and fibrinolysis by assembly from modules. *Cell*; **41**: 657-663
- Petersen, G.L. (1983): Determination of total protein. *Methods Enzymol.*; **91**: 95-119
- Picard, B., Arlet, G. & Goullet, P. (1984): *Aeromonas hydrophila* septicemia. Epidemiologic aspects. 15 cases. *Presse Med.*; **13**: 1203-1205
- Powers, J.C., Gupton, B.F., Harley, A.D., Nishino, N. & Whitley, R.J. (1977): Specificity of porcine pancreatic elastase, human leukocyte elastase and cathepsin G. Inhibition with peptide chloromethyl ketones. *Biochim. Biophys. Acta*; **485**: 156-166
- Prendergast, F.G. & Mann, K.G. (1977): Differentiation of metal ion-induced transitions of prothrombin fragment 1. *J. Biol. Chem.*; **252**: 840-850
- Pulverer, G., Wegrzynowicz, Z., Ko, H.L. & Jeljaszewicz, J. (1980): Prothrombin and plasminogen activators produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Zentralbl Bakteriol A*; **247**: 112-117

- Rao, L.V. & Rapaport, S.I. (1988): Activation of factor VII bound to tissue factor: a key early step in the tissue factor pathway of blood coagulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*; **85**: 6687-6691
- Rhee, M.J., Morris, S. & Kosow, D.P. (1982): Role of meizothrombin and meizothrombin-(des F1) in the conversion of prothrombin to thrombin by the *Echis carinatus* venom coagulant. *Biochemistry*; **21**: 3437-3443
- Rogolsky, M. (1979): Nonenteric toxins of *Staphylococcus aureus*. *Microbiol. Rev.*; **43**: 320-360
- Rosenberg, R.D. & Damus, P.S. (1973): The purification and mechanism of action of human antithrombin-heparin cofactor. *J. Biol. Chem.*; **248**: 6490-6505
- Rosing, J. & Tans, G. (1991): Inventory of exogenous prothrombin activators. For the Subcommittee on Nomenclature of Exogenous Hemostatic Factors of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *Thromb. Haemost.*; **65**: 627-630
- Ruggeri, Z.M. & Zimmerman, T.S. (1987): von Willebrand factor and von Willebrand disease. *Blood*; **70**: 895-904
- Sadler, J.E. & Davie, E.W. (1987). In: The Molecular Basis of Blood Diseases (Stamatoyannopoulos, G., Nienhuis, A.W., Leder, P. & Majerus, P.W., Hrsg.), pp. 575-630, W.B. Saunders Co., Philadelphia, PA.
- Sakai, T., Lund-Hansen, T., Paborsky, L., Pedersen, A.H. & Kisiel, W. (1989): Binding of human factors VII and VIIa to a human bladder carcinoma cell line (J82). Implications for the initiation of the extrinsic pathway of blood coagulation. *J. Biol. Chem.*; **264**: 9980-9988
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*; **74**: 5463-5467
- Savage, B. & Ruggeri, Z.M. (1991): Selective recognition of adhesive sites in surface-bound fibrinogen by glycoprotein IIb-IIIa on nonactivated platelets. *J. Biol. Chem.*; **266**: 11227-11233
- Schechter, I. & Berger, A. (1967): On the size of the active site in proteases. *Biochim. Biophys. Res. Commun.*; **27**: 157-162
- Schiffman, S., Theodor, I. & Rapaport, S.I. (1969): Separation from *Russell's viper venom* of one fraction reacting with factor X and another reacting with factor V. *Biochemistry*; **8**: 1397-1405
- Schoel, B., Welzel, M. & Kaufmann, S.H. (1995): Quantification of protein in dilute and complex samples: modification of the bicinchoninic acid assay. *J. Biochem. Biophys. Methods*; **30**: 199-206

- Scott, E.G., Russell, C.M., Noell, K.T. & Sproul, A.E. (1978): *Aeromonas hydrophilia* sepsis in a previously healthy man. *JAMA*; **239**: 1742
- Scottrup-Jensen, L. (1987). In: The Plasma Proteins (Putnam, F.W., Hrsg.), Vol. 5, pp. 191-291, Academic Press, New York
- Seegers, W.H. (1986): Postclotting fates of thrombin. *Semin Thromb Hemost*; **12**: 181-183
- Stassens, P., Bergum, P.W., Gansemans, Y., Jespers, L., Laroche, Y., Huang, S., Maki, S., Messens, J., Lauwereys, M., Cappello, M., Hotez, P.J., Lasters, I. & Vlasuk, G.P. (1996): Anticoagulant repertoire of the hookworm *Ancylostoma caninum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*; **93**: 2149-2154
- Stenflo, J. (1970): Dicumarol-induced prothrombin in bovine plasma. *Acta. Chem. Scand.*; **24**: 3762-3763
- Stenflo, J. & Ganrot, P.O. (1973): Binding of Ca²⁺ to normal and dicoumarol-induced prothrombin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; **50**: 98-104
- Stenflo, J., Ferlund, P., Egan, W. & Roepstorff, P. (1974): Vitamin K dependent modifications of glutamic acid residues in prothrombin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*; **71**: 2730-2733
- Stenflo, J. & Suttie, J.W. (1977): Vitamin K-dependent formation of gamma-carboxyglutamic acid. *Annu. Rev. Biochem.*; **46**: 157-172
- Stone, S.R. & Hofsteenge, J. (1986): Kinetics of the inhibition of thrombin by hirudin. *Biochemistry*; **25**: 4622-4628
- Stone, S.R., Braun, P.J. & Hofsteenge, J. (1987): Identification of regions of alpha-thrombin involved in its interaction with hirudin. *Biochemistry*; **26**: 4617-4624
- Stubbs, M.T., Oschkinat, H., Mayr, I., Huber, R., Angliker, H., Stone, S.R. & Bode, W. (1992): The interaction of thrombin with fibrinogen. A structural basis for its specificity. *Eur. J. Biochem.*; **206**: 187-195
- Suttie, J.W. (1985): Vitamin K-dependent carboxylase. *Annu. Rev. Biochem.*; **54**: 459-477
- Suzuki, K., Dahlback, B. & Stenflo, J. Thrombin-catalyzed activation of human coagulation factor V. *J. Biol. Chem.*; **257**: 6556-6564
- Suzuki, K., Nishioka, J. & Hashimoto, S. (1983): Protein C inhibitor. Purification from human plasma and characterization. *J. Biol. Chem.*; **258**: 163-168
- Switalski, L.M., Schwam, O., Smyth, C.J. & Wadstrom, T. (1978): Peptocoagulase: clotting factor produced by bovine strains of *Peptococcus indolicus*. *J Clin Microbiol*; **7**: 361-367

- Tans, G. & Rosing, J. (1986): Multicomponent enzyme complexes of blood coagulation. In: Blood coagulation (Zwaal, R.F.A. & Hemker, H.C., Hrsg.), pp. 59-85, Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford.
- Tollefsen, D.M., Majerus, D.W. & Blank, M.K. (1982): Heparin cofactor II. Purification and properties of a heparin-dependent inhibitor of thrombin in human plasma. *J. Biol. Chem.*; **257**: 2162-2169
- Tracy, P.B., Nesheim, M.E. & Mann, K.G. (1981): Coordinate binding of factor Va and factor Xa to the unstimulated platelet. *J. Biol. Chem.*; **256**: 743-751
- Tracy, P.B. (1988): Regulation of thrombin generation at cell surfaces. *Semin. Thromb. Hemost.*; **14**: 227-233
- van Dam-Mieras, M.C.E. & Muller, A.D. (1986): Blood coagulation as a part of the haemostatic system. In: Blood Coagulation (Zwaal, R.F.A. & Hemker, H.C., Hrsg.), pp. 1-13, Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford.
- Van Dieijen, G., Tans, G., Rosing, J. & Hemker, H.C. (1981): The role of phospholipid and factor VIIIa in the activation of bovine factor X. *J. Biol. Chem.*; **256**: 3433-3442
- Vehar, G.A. & Davie, E.W. (1980): Preparation and properties of bovine factor VIII (antihemophilic factor). *Biochemistry*; **19**: 401-410
- Vu, T.K., Hung, D.T., Wheaton, V.I. & Coughlin, S.R. (1991): Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell*; **64**: 1057-1068
- Walker, F.J. (1981): Regulation of bovine activated protein C by protein S: the role of the cofactor protein in species specificity. *Thromb. Res.*; **22**: 321-327
- Walker, F.J. (1988): Interactions of protein S with membranes. *Semin. Thromb. Hemost.*; **14**: 216-221
- Waxman, L., Smith, D.E., Arcuri, K.E. & Vlasuk, G.P. (1990): Tick anticoagulant peptide (TAP) is a novel inhibitor of blood coagulation factor Xa. *Science*; **248**: 593-596
- Wegrzynowicz, Z., Heczko, P.B., Drapeau, G.R., Jeljaszewicz, J. & Pulverer, G. (1980): Prothrombin activation by a metalloprotease from *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.*; **12**: 138-139
- Weiss, H.J., Turitto, V.T., Baumgartner, H.R., Nemerson, Y. & Hoffmann, T. (1989): Evidence for the presence of tissue factor activity on subendothelium. *Blood*; **73**: 968-975
- Wilcox, J.N., Smith, K.M., Schwartz, S.M. & Gordon D. (1989): Localization of tissue factor in the normal vessel wall and in the atherosclerotic plaque. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **86**: 2839-2843

- Woods, D.E. & Iglewski, B.H. (1983): Toxins of *Pseudomonas aeruginosa*: new perspectives. *Rev. Infect. Dis.*; **5**: 715-722
- Yamada, D., Sekiya, F. & Morita, T. (1996): Isolation and characterization of carinactivase, a novel prothrombin activator in *Echis carinatus* venom with a unique catalytic mechanism. *J Biol Chem*; **271**: 5200-5207

6. Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden 11 Bakterienstämme auf die Fähigkeit zur Bildung eines Prothrombin-Aktivators hin untersucht. Diese Untersuchung führte zur Entdeckung und Isolierung einer Prothrombin aktivierenden Aktivität aus dem fakultativ humanpathogenen Wasserkeim *Aeromonas hydrophila*, der Fischinfektionen und Durchfall beim Menschen verursacht. Datenbankrecherchen ergaben eine 90 %ige Sequenzidentität sowohl mit der Pro-Aminopeptidase Processing Protease aus *Aeromonas caviae*, als auch mit einer Elastase aus *Aeromonas hydrophila*. Der Prothrombin-Aktivator wurde biochemisch charakterisiert. Es handelt sich um eine einkettige Metalloprotease, die ein Molekulargewicht von 35 kDa und einen isoelektrischen Punkt bei $pI = 4,4$ aufweist. Die enzymatische Aktivität ist thermostabil und bleibt bis zu einer Temperatur von 55°C vollständig erhalten. Maximale Aktivität zeigt sich bei pH 6 in Gegenwart von 0 bzw. 1,5 M NaCl. Die Michaelis-Menten-Konstante K_M und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit v_{\max} für die Prothrombin-Aktivierung betragen $1,77 (1,47) \mu\text{M}$ und $0,81 (1,66) \text{ mol}/(\text{min} \times \text{mol Enzym})$ bei einer NaCl-Konzentration von 0 (1,5) M. Eine Analyse der Prothrombin-Spaltprodukte zeigte, dass unter anderem authentisches Thrombin entsteht, das seinerseits weiter abgebaut wird. Neben Prothrombin werden weitere Plasmaproteine (u.a. Fibrinogen und α_2 -Makroglobulin) gespalten.

Ein fluorogenes Testsystem wurde etabliert, das die Bestimmung des Prothrombin-Gehalts in Plasma mit Hilfe der bakteriellen Protease mit hoher Sensitivität und Genauigkeit ermöglicht. Die vorliegenden Erkenntnisse lassen einen Einsatz des Enzyms als analytisches Werkzeug im Bereich der Gerinnungsdiagnostik als möglich erscheinen. Eventuell wäre es eine billigere und in größeren Mengen erzeugbare Alternative zu herkömmlichen Prothrombin-Aktivatoren aus Schlangengiften, die im Bereich der Gerinnungsanalytik eingesetzt werden, wie beispielsweise dem Ecarin aus dem Gift der Schlange *Echis carinatus*.

7. Abkürzungen und Symbole

A _x	Absorption bei x nm
Abb.	Abbildung
AMC	7-Amido-4-methylcoumarin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Ammoniumsulfat
ATIII	Antithrombin III
BCA	Bicinchoninsäure
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat-4-toluidinsalz
BICINE	N,N-bis[2-Hydroxyethyl]glycin
BIS-TRIS	2-bis[2-Hydroxyethyl]amino-2-[hydroxymethyl]-1,3-propandiol
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
Boc	t-Butoxycarbonyl
Bzl	Benzoyl
Da	Dalton
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DIG	Digoxigenin
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E-64	L-trans-Epoxysuccinylleucylamido-(4-guanidino)-butan
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECV	<i>Echis carinatus venom</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-tetraessigsäure
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
Hrsg.	Herausgeber
HSA	Humanes Serumalbumin
Kap.	Kapitel
K _M	Michaelis-Menten-Konstante

M	molar
MES	2-[N-Morpholino]ethansulfonsäure
min	Minute
NBT	<i>p</i> -Nitro-blue-tetrazolium
NEM	N-Ethylmaleinimid
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PHBSP	Plasma-hyaluronsäurebindende Serinprotease
pI	isoelektrischer Punkt
PIPES	Piperazin-N,N'-bis[2-ethansulfonsäure]
PL	Phospholipide
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pNA	<i>p</i> -Nitroanilid
pNPP	<i>p</i> -Nitrophenylphosphat
PPACK	D-Phe-Pro-Arg-chloromethylketon
PVDF	Polyvinylidenfluoridmembran
rpm	Umdrehungen pro Minute
RVV	<i>Russel's Viper Venom</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
Tab.	Tabelle
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TF	Gewebefaktor (Tissue Factor)
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
u	Unit, Einheit der Enzymaktivität
UV	Ultraviolett
v _{max}	Maximale Reaktionsgeschwindigkeit
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Masse pro volumen

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Thorsten Keller
Geburtsdatum: 26.06.1970
Geburtsort: Darmstadt
Familienstand: ledig

Schulbildung

1977 - 1981 Eiche-Schule (Grundschule) in Ober-Ramstadt
1981 - 1987 Georg-Christoph-Lichtenberg-Schule (Gesamtschule) in Ober-Ramstadt
1987 - 1990 Bertolt-Brecht-Schule (Gymnasiale Oberstufenschule) in Darmstadt
Juni 1990 Abitur

Zivildienst

1990 - 1991 Zivildienst im Elisabethenstift in Darmstadt

Studium

1991 - 1997 Studium der Chemie an der Technische Hochschule Darmstadt
1993 Diplomvorprüfung
1997 Diplomhauptprüfung
1997 Diplomarbeit am Institut für Biochemie der Technischen Hochschule Darmstadt unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. A. Skerra.
Titel: „Engineering des Bilin-Bindungsproteins für die Bindung von Testosteron“
November 1997 Abschluss des Studiums mit „sehr gut“ und Erreichen des akademischen Grades „Diplom-Ingenieur“

Promotion

1998 - 2001 Doktorarbeit am Paul-Ehrlich-Institut in Langen unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. R. Seitz und Herrn Prof. Dr. H. G. Gassen (Institut für Biochemie, Technische Universität Darmstadt)
Titel: „Isolierung und Charakterisierung eines bakteriellen Prothrombin-Aktivators“

Thorsten Keller

07.05.2001

Jägertorstr. 41

64291 Darmstadt

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich meine Dissertation selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

Thorsten Keller

07.05.2001

Jägertorstr. 41

64291 Darmstadt

Erklärung

Ich erkläre hiermit, noch keinen Promotionsversuch unternommen zu haben.